ثورة في التكنولوجيا الحيوية





المشروع القومي للترجمة

إعداد : چين ل . ماركس
ترجمة : هاشم أحمد محمد
مراجعة : ابراهيم عبد المقصود ابراهيم

299

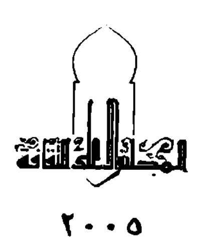
المشروع القومى للترجمة

ثـــــورة
فى التكنولوجيا الحيوية

إعداد : جين ل. ماركس

ترجمة: هاشم أحمد محمد

مراجعة : إبراهيم عبد المقصود إبراهيم



٢٠٠٥

المشروع القومى للترجمة

إشراف: جابر عصفور

- العدد: ٢٩٩
- ثورة فى التكنولوجيا الحيوية
- جين ماركس
- هاشم أحمد
- الطبعة الأولى ٢٠٠٥

هذه ترجمة كتاب:

A Revolution in Biotechnology

Edited by: Jean L. Marx

Published on behalf of the ICSU Press

by the Press Syndicate of the

University of Cambridge

شارع الجبلاية بالأوبرا - الجزيرة - القاهرة ت:٧٣٥٢٣٩٦ فاكس:٧٣٥٨٠٨٤

El Gabalaya St., Opera House, El Gezira, Cairo

Tel:7352396 **Fax:** 7358084

ثـــورة فى التكنولوجيـــا الحيويـــة

بعون الله وفضله تمت ترجمة هذا الكتاب ومراجعته،والذى يعد من الكتــب المهمة فى مجال التكنولوجيا الحيوية،والذى نتقدم به إلى المكتبة العربيـــة،ليكون عونًا بإذن الله للدارسين والباحثين فى مجال التكنولوجيا الحيوية وللقارئ العام.

ويشمل هذا الكتاب ستة عشر فصلاً،والتى تعتمد أساساً على دراسة الوراثـــة والجينات فى الكائنات الحيـــة الدقيقـــة، ومـــدى الإفـــادة منهـــا فـــى تخليـــق البروتين،وكذلك دراسة الأحماض النووية(RNAوDNA)،وكذلك دراســـة تثبيـــت النتروجين ودور البكتيريا فيه.

كما تطرق الكتاب إلى دراسة مزارع الخلايـــا والأنســـجة النباتيـــة ومـــدى الاستفادة منها فى إنتاج نباتات خالية من الأمراض،ثم إكثار هذه النباتات بكميات كبيرة،وكذلك الاستفادة من هذه التكنولوجيا لكل مـــن مربـــى النبـــات والمنـــتج للمركبات الثانوية التى تدخل فى صناعة الدواء.

وتطرق الكتاب أيضًا إلى دراسة المناعة،ومدى الإفادة منها فـــى المجـــالات الحيوية المختلفة،خاصة فى مجال الطـــب،ونخص بالـــذكر اســـتخدام تكنيـــك الـــــELIZA للكشف عن الكثير من الفيروسات،وكذلك دراسة الطرق الحديثـــة المستخدمة فى تشخيص الأمراض الوراثية،وبالإشارة فى هذا الصدد إلى مستقبل العلاج بالجين للأمراض الوراثية البشرية وفى النهايـــة،يختم مؤلـــف الكتـــاب

بدراسة عن التنافس الدولى والاستراتيجيات التنظيمية فى مجـال التكنولوجيـا الحيوية.

كما أن هذا الكتاب مزود بمسردين لتفسـير المصـطلحات العلميـة-طبقًـا للأبجدية العربية وطبقا للأبجدية الإنجليزية- المستخدمة فى مجال التكنولوجيـا الحيوية،حتى يسهل على القارئ الاستفادة بأكبر قدر من هذه الموضوعات الشيقة التى يحتاج إليها كل دارس للعلوم الحيوية.

ولقد عمِّم استخدام التكنولوجيا الحيوية فـى مجـالات عديـدة،ففى المجـال الطبى،شملت إنتاج الأدوية والأمصال وتشخيص وعلاج الأمـراض الوراثيـة البشرية،والتقليل من تلوث البيئة،وكذلك إنتاج كيماويات دوائية ومضادات حيوية بتكلفة أقل وبمعدل إنتاجية عالية،كما ساعدت التكنولوجيا الحيوية علـى إنتـاج أمصال تركيبية ، خاصة تلك التى ينطوى إنتاجها بالطرق التقليدية على بعـض المخاطر،مثل التهاب فيروس الكبد الوبائى.

كما اشتملت أيضًا على إنتاج الأنسولين البكتيرى ،البـديل عـن الأنسـولين التقليدى المستخرج من البقر والخنازير،وإنتاج هرمون النمو لمعالجة القزامـة البشرية وبطء النمو،وأيضًا إنتاج بروتين الإنترفيرون البشرى،وهو عبارة عـن جليكوبروتين فعال ضد الأمراض الفيروسية،ويستفاد منه فى السـيطرة علـى مرض السرطان،حيث يساعد على تثبيط نمو الخلايا السرطانية،ويحفز الجهـاز المناعى لاحتواء الخلايا السرطانية ومنع انتشارها، والتشخيص المبكر لـبعض الأمراض الوراثية مثل الأنيميا المنجلية والبول الفينولى(**RKU**).

كما شمل استخدام التكنولوجيا الحيوية أيضًا معالجة الجينات،مثل إضافة جين انتاج الأنسولين فى الكروسوسوم البشرى مما يؤدى إلى إمكانية شفاء الإنسـان

المريض بمرض البول السكرى شفاء تامًا،وكذلك علاج بعض أمراض نقص المناعة.

وفى المجال البيئى،تعددت استخدامات التكنولوجيا الحيوية التى عالجها هذا الكتاب بالتفصيل ومنها:

إنتاج بكتيريا بحرية مهندسة وراثيًا ، وقادرة على القضاء على التلوث الناشئ من بقع البترول المتسربة فى البحار والمحيطات،حيث تعمل البكتيريا على تحليلها إلى مركبات بسيطة وهضمها،وبذلك يتم التخلص منها،وإنتاج ميكروبات تقوم بمعالجة مياه الصرف الصحى والتخلص من المواد الضارة والروائح وجعلها صالحة لأغراض مختلفة.

وفى المجال الزراعى،كان للتكنولوجيا الحيوية الدور الأكبر،حيث تطورت الأبحاث فى هذا المجال تطورًا فاق التصور،حيث أدت إلى زيادة الإنتاج النباتى والحيوانى، فلقد تم نقل جينات تثبيت النتروجين الجوى والمعروفة باسم جينات **nif**، إلى النباتات النجيلية مثل القمح والشعير والذرة،بحيث جعلتها قادرة على تكوين عقد بكتيرية،وتحصل على احتياجاتها من النتروجين من الجو بدلاً من الاعتماد على الأسمدة النتروجينية،مما يساعد على تقليل تكلفة الإنتاج.

وإنتاج نباتات قطن مقاوم لدودة ورقة القطن،وذلك بإعادة صياغة وكلونة جين**BT**،المستخلص من البكتيريا**Bacillus Ehuriengi**،وهو المسئول عن إفراز مادة سامة وقاتلة للدودة،ويتم إدخاله إلى جينوم نباتات القطن أو الطماطم،مما يجعل عصارة أوراق النبات سامة بالنسبة للدودة فيقضى عليها،وتكتسب النباتات صفة المقاومة بدون الحاجة إلى رش المبيدات المكلفة وفى نفس الوقت يؤدى إلى تقليل تلوث البيئة.

نقل صفة المقاومة لمبيدات الحشائش إلى النباتات الاقتصـــادية خاصـــة وأن استخدام المبيدات الانتقائية أصبح له محاذير نظرًا للتأثير السام المتبقى وأثـــره الضار على صـــحة الإنســـان والحيـــوان،فيتم نقـــل جـــين(Glyphosate (G.R. resistant،الذى يجعل النبات المرغوب مقاومًا للمبيدات ذات المفعول الممتد،بينما تكون الحشائش حساسة لهذا المبيد فتهلك.

وفى مجال الغذاء فللتكنولوجيا الحيوية تأثيرها الواضح فى إنتاج البروتينات المهمة بكميات كبيرة وبتكلفة أقل،باستخدام ما يسمى الناقل المكـــوكى، وكـــذلك إنتاج بروتينات عالية القيمة الحيوية،كغذاء للماشية والدواجن،وذلك من الخميرة والبكتيريا،عن طريق إدخال جينات نشطة للسيطرة على بناء البروتين فيها مما يجعلها بمثابة مصانع بيولوجية لإنتاج كميات كبيرة من هذه البروتينات المسماة ببروتينات الكائنات وحيدة الخلية ، كما أمكن إنتـــاج ســـلالات مـــن الخميـــرة وميكروبات التخمر المعاد صياغتها،والتى يكون باستطاعتها إنتاج كميات هائلة من الكحولات والمركبات العضوية بطرق غير تقليدية وبأسعار رخيصة.

وساعدت التكنولوجيا الحيوية أيضًا على نقل صفة المناعـــة ضـــد بعـــض الأمراض الفيروسية إلى الدواجن،وكذلك إنتاج بعض البروتينات البشرية المهمة ذات الأثر الطبى الفعال،مثل عوامل تجلط الـــدم،وزيادة إدرار ألبـــان الماشـــية وصوف الأغنام المحولة وراثيًا.

وإننا لنرى نهضتنا العلمية المباركة وقد شملت جميع وسائل التعليم،فلم يكـــن بد من أن تنال التكنولوجيا الحيوية نصيبها من الإتقان حتى تساير التطور العلمى اليوم،ولقد اتضح ذلك من إنشاء معاهد الهندسة الوراثية والتكنولوجيا الحيوية فى

الجامعات والمراكز العلمية لتقدم للمجتمع الجديد فى هذا المجال،من أجل حـــل مشاكل المجتمع فى جميع نواحى الحياة،من زراعة وطب وصيدلة وخلافه.

وإننا لنهدى هذا العمل إلى مصرنا الحبيبة راجين الله ســـبحانه وتعـــالى أن تكون خطوة فى طريق التقدم العلمى.

د.إبراهيم عبد المقصود إبراهيم

مقدمـــة المترجـــم

التكنولوجيا الحيوية هى مجموعة أساليب صناعية تهدف إلى استغلال المادة الحية أو نواتجها من أجل صنع أشياء مفيدة للإنسان، وليست التكنولوجيا الحيوية تكنولوجيا حديثة العهد،لكنها قديمة قدم الإنسان نفسه على وجه الأرض، فخميرة البيرة، التى تستخدم فى إنضاج الخبز،علـــى ســـبيل المثـــال هـــى تكنولوجيـــا حيوية،وبالمثل كل عمليات التخمر التى تقوم بها البكتيريا، تنـــدرج فـــى هـــذا المجال،والفرق بين التكنولوجيا الحيوية القديمة والتكنولوجيا الحيويـــة القائمـــة حاليًا،هو أن الأخيرة تعتمد على الاكتشافات العلمية الحديثة فى مجال الوراثـــة والتطبيق العلمى المبنى على الأبحاث الحقلية والتجارب المعمليـــة،بينما كانـــت تعتمد فى الماضى على المحاولة والخطأ.

وتعددت استخدامات التكنولوجيا الحيوية فى مجـــالات كالطـــب والصـــيدلة والزراعة وتصنيع الأغذية،وفى مجال التعدين أيضًا،فنجدها فى مجال الطب قد ساعدت على ابتكار طرق جديدة للكشف عن الأمراض الوراثية التـــى عانـــت البشرية من ويلاتها ردحاً طويلاً من الزمن،بالإضافة إلى اكتشاف طرق لعـــلاج أمراض العصر كمرض الإيدز والتهاب الكبد الوبائى (ب) .

كما ساهمت التكنولوجيا الحيوية أيضًا فى مجال العقاقير من خـــلال ابتكـــار عقاقير لعلاج الأمراض البشرية، وساهمت أيضاً بجهـــد ملحـــوظ فـــى مجـــال الزراعة،من خلال تحسين سلالات المحاصيل النباتية،وابتكار مبيدات بيولوجية لمقاومة الآفات الزراعية.

والدول النامية ومن بينها مصر فى حاجة ماسة للاســـتفادة مـــن تطبيقـــات التكنولوجيا الحيوية فى مجالاتها المختلفة لما لها تأثير مفيد يعود بالخير علـــى

البلاد،لكن ذلك لن يتأتى إلا من خلال تضافر جهـود مراكـز الأبحـاث فـى الجامعات والبحث العلمى ودعم الحكومة المباشر من خلال الوزارات المعنية.

وكما أن للتكنولوجيا الحيوية جوانبها المضيئة التـى تعـود بـالنفع علـى الإنسان،فلها أيضاً جوانبها السيئة، فقد يستخدمها العلماء بطريـق الخطـأ فـى إطلاق كائنات حية لها أثرها السيئ على البيئة،أو قد يجـرى اسـتغلالها فـى الحروب البيولوجية المدمرة، وعلى أية حال،سوف يـؤدى التقـدم فـى هـذه التكنولوجيا إلى إثارة موضوعات جدلية عديدة،والتى سيكون الحكم النهائى فيها لوعى الشعب وإدراكه بإيجابيات وسلبيات هذه التكنولوجيا.

ويشمل هذا الكتاب ستة عشر فصلاً،ناقشت الجوانب المختلفة لاسـتخدامات التكنولوجيا الحيوية،بالإضافة إلى مسردين أحدهما وفقاً للأبجديـة الإنجليزيـة والآخر وفقاً للأبجدية العربية.

وأرجو أن أكون قد أسهمت بجهد متواضع فى توضيح مفهـوم التكنولوجيـا الحيوية للقارئ العربى المتعطش للمعرفة،كما أرجو أن يستفيد منه القارئ العام لإثراء معرفته بهذا الموضوع المهم الذى يعتبر جديداً إلى حد ما بالنسـبة لنـا، ويسير فى ركب التطور الذى تشهده بلادنا فى كافة الميادين.

هاشم أحمد محمد

تقديم بقلم جون كندرو

رئيس المجلس الدولى للاتحادات العلمية

هذا هو أول كتاب فى سلسلة الكتب عن موضوعات علمية مهمـــة للقـــارئ العام،يرعاها المجلس الدولى للاتحادات العلمية(I C SU)،وهى منظمة عالميـــة تمثل علماء محترفين،وأهم جزء من مسئوليتها إطلاع الجمهور علـــى جوانـــب التقدم العلمى،الذى سيؤثر بدرجة كبيرة على حياتنا، أو الذى سيثرى معارفنا عن العالم الذى نعيش فيه، وإحدى الجهات المنوط بها تنفيذ هذه المهمة،هى وكالـــة مؤسسة نشر الـــــICSU،التى تنشر هذا الكتاب بالتعاون مـــع مؤسســـة نشـــر جامعة كمبردج.

ومما لاشك فيه أن التكنولوجيا الحيوية تعد من الموضوعات العلمية المهمة، فخلال السنوات القليلة الماضية،بدأت التكنولوجيا الحيوية فى تحويل العديد مـــن أجزاء الكيمياء الصناعية ومن الزراعة والطب ، ذلك التحويل الذى خرج مـــن المعمل إلى التطبيق العلمى بسرعة ملفتة للنظر، وقد اختير عنوان الكتاب بدقـــة بالغة؛فمما لاشك فيه أنه توجد حالياً ثورة فى أساليب وتطبيقـــات التكنولوجيـــة الحيوية فى حين لا تعتبر التكنولوجيا الحيوية من الموضوعات الجديدة.

وتخمير الجعة، الذى يعد واحداً من أقدم الصناعات فى العالم، يعتمـــد علـــى عملية تكنولوجيا حيوية نموذجية، وتربية الحيوانات الأليفة تعتبر أيضاً تكنولوجيا حيوية، فإذا قبلنا التعريف المألوف للتكنولوجيا الحيوية،على أنه اســـتغلال – أو

استدجان ،تبعاً لوجهة النظر– لكائنات حية أخرى لمنفعة الإنسان، فقــد يكــون الكائن الحى الآخر: حيوان ثديى كبير مثل بقرة أو خنزير، وقد يكــون نبــات كالقمح أو البطاطس، أو قد يكون كائناً مجهرياً كالخميرة المستخدمة فى تخميــر البيرة، أو بكتيريا،كما هو الحال فى العديد من العمليات التــى يتضــمنها هــذا الكتاب.

وعموماً ،فالإنسان غير راض عن إنتاجية الكائنات الحية الأخرى فى حالتها الطبيعية، وعلى ذلك، فإن تربية الكائن الحيوى(سواء كان نباتا أم حيوانا أم كائناً مجهرياً) يعد أمرًا ضروريًا من أجل إجراء تغير دائم فى التركيبــة الوراثيــة للكائن الحى–تغير يحدث فى الرسالة الوراثية التى يمررها إلى ذريته–من أجل زيادة الناتج المرغوب،سواء أكان هــذا النــاتج كحــولاً أم بروتينــا أم مــادة كربوهيدراتية ، وعلى مدى التاريخ،كانت تربية الكائن الحى العنصر المحدد فى تحسين التكنولوجيا الحيوية،لأن طرق بدائية،كالتى ذكر البعض منها فى العهــد القديم ،كانت بطيئة وتجريبية وتجرى بطريقة المحاولة والخطأ، وفى الواقع،فإن طرق التربية لم تتحسن بالقدر الكبير، من حيث المبدأ، حتى فى الأزمنة الحديثة.

وقد نشأت الثورة التى أعطت لهذا الكتاب اسمه من خلال اكتشــاف طــرق جديدة بشكل جذرى لتغيير التركيبة الوراثية للكائنات المجهرية بطريقة موجهة، وتنعقد الآمال فى المستقبل على إمكانية تطور هذه الطرق مــن حيــث المبــدأ والواقع العملى لتشمل الكائنات الحية الراقية، أى النباتات والحيوانات، وتعتمــد هذه القدرة الجديدة على اكتشافات البيولوجيا الجزيئية من الــــ د.ن.أ كمــادة وراثية، وعلى الشفرة الوراثية للعلاقة بين الجينات والبروتينات التــى تنتجهــا،

وعلى طرق قراءة الرسالة الوراثية من خلال تسلسل الجينات، وعلى إنزيمـــات القطع التى يمكن بواسطتها قطع ووصل قطاعات الـــ د.ن.أ ببعضها بطريقـــة دقيقة ، وهذه العناصر والعناصر الأخرى العديدة التى تشكل موضوع يعـــرف بـــالوراثة الجزيئية،تجعل من الممكن حالياً تربية كائنات مجهرية حسب الطلب ،بدلاً من استخدام طريقة المحاولة والخطأ التى كانت تتبع فى العصور القديمة .

وكان من نتيجة ذلك،زيادة هائلة فى إمكانات التكنولوجيا الحيوية،حيث تعمل على تحويل جوهر الموضوع كله إلى العديد من التطبيقات الجديدة،التى أصبحت على درجة كبيرة من الأهمية ،ليس فقط للعالم المتقدم،بل للعالم النامى أيضـــاً، ومن غير المثير للدهشة،فقد جلبت هذه الإمكانات الجديدة معها مشاكل تنظيميـــة وأخلاقية جديدة.

وبدأت التكنولوجيا الحيوية تؤثر بالفعل على حياتنا،وسوف يصبح تأثيرها فى المستقبل عظيماً ، ويهدف هذا الكتاب إلى توضيح الخلفية العلمية،وإلى التعريف بما تم تحقيقه بالفعل،وإلى مناقشة المشاكل الأخلاقية،وإلى اقتراح ما يحتمـــل أن يأتى به المستقبل، وموضوع هذا الكتاب يعد مهماً بما يثيره من متعة فكرية.

الفصل الأول:

الوراثـــة، و الجينـــات، و الــ د.ن .أ

Heredity, genes and DNA

يقصد بالتكنولوجيا الحيوية استخدام كائنات عضوية حية أو مواد مستخلصة من كائنات عضوية حية لصنع منتجات مفيدة للإنسان ، وتمتد جذور التكنولوجيا الحيوية فى أعماق التاريخ البشرى،حيث وضع أجدادنا الأوائل أصول هذا العلم منذ ما يقرب من مائة قرن مضت،إبان العصر الحجرى،عندما بدأوا لأول مــرة فى استئناس الحيوانات الأليفة، وزراعة المحاصيل النباتية من أجل الغذاء، بدلاً من اعتمادهم الوحيد على ما يستطيعون جمعه وقنصه من البرية.

والكائنات العضوية المستخدمة حالياً فى التكنولوجيا الحيوية كائنات عضوية يمكن أن تكون كائنات معقدة كماشية الألبان، أو كائنات بسيطة كالخمائر اللازمة لتخمير البيرة وإنضاج الخبز؛ وحتى البكتيريا وحيدة الخلية يمكن الاستفادة منها لأنها تمدنا بعقاقير، تشمل مضادات حيوية مثل البنسلين،بالإضــافة إلــى عــدة منتجات كيميائية معقدة أخرى يصعب الحصول عليها من خلال عمليات التخليق المعملى.

وقد سعى المزارعون والممارسون الآخرون للتكنولوجيا الحيوية دائماً إلــى تحسين الكائنات الحية التى يعتمدون عليها فى معيشتهم، وتعتبر تربية الماشــية من أجل زيادة إدرار الألبان أحد هذه الأمثلة، ويمكن أيضاً تربيــة المحاصــيل

النباتية لتحقيق غاية تتمثل فى إنتاجية أعلى، أو شدة تحمل أعلى للظروف المناخية والبيئية، أو مقاومة الأمراض.

وقد مهدت ملاحظة بسيطة ـ بأن الصفات الطبيعية تورث ـ السبيل لهذه الجهود، فمن السهل أن نرى أن الآباء يورثون ملامحهم الشخصية إلى ذريتهم،وتتبع أصل ملامح مولود جديد يعتبر من الطقوس الشائعة فى العائلات ،حيث تشبه عيون الابنة عيون أبيها، ويشبه أنفها أنف جدتها.

ويمكن تطبيق ملاحظات وراثية مشابهة موجودة لتحسين الحيوانات الداجنة والنباتات، فمنتج الألبان الذى يرغب فى تحسين إنتاجية الألبان لماشيته ، يستطيع أن ينتخب الماشية التى تعطى له إنتاجية عالية، وبطريقة مماثلة ، يعمل المزارع أيضاً على تهجين النباتات بصفات مرغوبة، ولا يختار للتزاوج الآخر بعد ذلك إلا الذرية التى ثبت له أنها تحمل الصفة الممتازة أو الصفات التى يبحث عنها.

وقد حققت هذه الجهود المبذولة فى تربية النباتات نجاحات كبيرة، فخلال الفترة من عام ١٩٤٠-١٩٨٠، وصلت غلة الهكتار من محاصيل الحبوب الرئيسة-القمح والذرة والأرز-إلى الضعف أو حتى ثلاثة أمثال ما كانت عليه من قبل "هذه الثورة الخضراء"، التى اشتهرت بذلك الاسم ، قد نتجت من زراعة أنواع من الحبوب عالية الإنتاجية، واستخدام كميات كبيرة من الأسمدة التجارية، ومبيدات الآفات، ومبيدات الحشائش. وعلى الرغم من هذه النجاحات،فإن هناك قيودًا على ما يمكن أن تحققه التربية التقليدية ويمكن أن تكون العملية مضيعة للوقت، إذ تتطلب سنوات عديدة لنمو نوع جديد من نبات أو سلالة حيوانية مستقرة وراثياً، وعلاوة على ذلك، فقد لا تكون جميع عمليات التهجين التى

يرغب المربى فى إجرائها على النباتات أو الحيوانات ممكنة، فما يمكنه عمله يتقيد بعدم التوافق الوراثى للأنواع.

والسلالات المختلفة جداً من الناحية الوراثية ، إما أنها لا تنتج ذرية على الإطلاق عند تزاوجها، أو تنتج ذرية عقيمة، وعلى سبيل المثال، فالأرز البرى[1] قد يتفوق فى بعض الصفات على السلالات المزروعة ، مثل مقاومة ظروف الملوحة أو المرض، فى حين لا يمكن نقل هذه الصفات إلى أرز مزروع بالتهجين الجنسى.

بالإضافة إلى ذلك، فإن ممارسات الزراعة الحالية باعتمادها على الأسمدة التجارية ومبيدات الآفات تعتبر مكلفة، وغالباً ما لا يمكن تطبيقها فى الدول الفقيرة،التى تشتد فيها الحاجة إلى زيادة إنتاج الغذاء، وقد نبهت الممارسات أيضاً إلى خطورة التدهور البيئى، حيث يمكن أن تتسرب الأسمدة النتروجينية والفوسفاتية إلى المجارى المائية والمياه الجوفية، وغالبا ما يكون للمبيدات الحشرية ومبيدات الآفات تأثيرات سامة على الكائنات العضوية بما فيها الإنسان، خلافاً للغرض المستخدمة من أجله وهو القضاء على الحشرات والأعشاب.

وسوء التغذية والمجاعات التى تسود بقاع كثيرة فى العالم يرجع إلى مشكلة تتعلق أساساً بتوزيع الغذاء، وليس مشكلة نقص فى الغذاء ؛ فلدى الدول المتقدمة وعلى رأسها الولايات المتحدة الأمريكية فائض كبير من الغذاء، فى الوقت الذى تعانى شعوب الدول الفقيرة من عدم القدرة على إنتاج ما يكفيها منه.

---

(١) الأرز البري: نبات عشبي مستنقعي من النجيليات يزرع للتزيين أو لحبوبه الصالحة للأكل والتي تطعمها الطيور المائية المدجنة أيضاً. (معجم الشهابى فى مصطلحات العلوم الزراعية)

وعلى الرغم من هذه المشاكل، فلا يزال عدد سكان العالم يتزايد بصورة مطردة، ووفقاً للإحصاءات التى حصل عليها مكتب الإحصاء الأمريكي US Census Bureau، كان عدد سكان العالم فى عام ١٩٨٦ حوالى خمسة مليارات نسمة،ومن المتوقع أن يصل هذا العدد إلى أكثر من ستة مليارات نسمة بحلول عام ٢٠٠٠ وعلاوة على ذلك، فإن معدلات النمو السكانى ستكون أسرع فى المناطق التى تعانى من نقص شديد فى الغذاء.

ويتزايد عدد سكان الدول النامية الذين يمثلون فى الوقت الحالى(عام ١٩٨٩) ما يقرب من ٧٥ ٪ من المجموع الكلى لسكان العالم بمعدلات تصل إلى ثلاث مرات أسرع من سكان الدول المتطورة ، وتشير الأرقام إلى الحاجة إلى إنتاج سلالات جديدة من المحاصيل النباتية عالية الإنتاجية،التى يمكن زراعتها فى المناطق القاحلة أو المدارية، دون الحاجة إلى إنفاق المزيد من الأموال على الأسمدة ومبيدات الآفات التى تستخدم حالياً بصورة طبيعية فى الدول المتقدمة .

طبيعة الوراثة :

nature of heredity

وعموماً، لم تتطلب الإنجازات التى تمت حتى الآن فى تربية النبات والحيوان معرفة مفصلة بالآلية التى تعمل من خلالها الوراثة، ومن المؤكد أن أجدادنا فى العصر الحجرى،لم يكن لديهم دراية بالعناصر الداخلية التى توجه نمو وتطور نبات أو حيوان، وفى واقع الأمر ، لم يبدأ العلماء فى معرفة أسس الكيمياء الحيوية للوراثة إلا فى فترة الأربعينات والخمسينات من هذا القرن، فنحن نعلم الآن أن التعليمات لبناء مخلوق، سواء كان صغيرا وبسيطاً كالبكتيريا، أو ضخماً

ومعقداً كالفيل، هى تعليمات مشفرة فى الجينات، ونعرف مما تتكون هذه الجينات ــ أى من الحمض النووى الريبــى المنقــوص الأكســجينDNA، المعــروف بـــ د.ن.أ ــ ونعرف كيف تعمل .

وخلال الخمسة عشر عاماً الماضية على وجه الخصوص، اكتسب العلمــاء مهارة غير مسبوقة فى استغلال الجينات، وعزلها، ونسخها، وحتى نقلهــا إلــى أنواع غريبة، وهذه التطورات التى جاءت نتيجة اكتشاف تكنولوجيا الــ .د.ن.أ المطعم، ظهرت فائدتها العظيمة للعلم الأساسى للبيولوجيا الجزيئية، حيث مكنت الباحثين من سبر الأغوار العميقة لتركيب الجين ومعرفة وظيفته.

وعلاوة على ذلك، فقد فتحت التطورات مسارات جديدة لتطــوير ســلالات مهمة من الناحية الاقتصادية من النباتات والحيوانات ، وبــذلك أســهمت فــى الجهود المبذولة لتوفير المزيد من الطعام من أجل عالم يعانى مــن المجاعــة، وعلى سبيل المثال، وجد العلماء أن بإمكانهم إنتاج فئران تعادل ضعف وزنهــا الطبيعى إذا حقنت بجين الهرمون الذى يجعل الحيوانات تنمو بصــورة أكبــر، وهناك تجارب مشابهة يجرى تطبيقها على حيوانات المزرعة.

وللبحث العلمى أيضا فوائد طبية مهمة ، إذ يأمل الإكلينيكيون فى أن يتمكنوا من علاج بعض الأمراض الوراثية البشرية التى تسببها جينات معيبــة، وذلــك بإعطاء المرضى نسخا جديدة من الجينات السليمة، على الرغم مــن أنــه قــد تمضى سنوات طويلة قبل أن يصبح العلاج باستبدال الجين اختيارا إكلينيكيــا محققا -إذا أفلح - .

فى هذه الآونة،وفر نقل الجين على نطاق محــدود، مصــدر جديــد لتلــك المنتجات النادرة أو التى من غير الممكن الحصــول عليهــا ، وتشــمل هــذه

المنتجات هرمون النمو البشري**human growth hormone**، الذى يستخدم فـــى علاج الأطفال الذين لا تنمو أجســامهم بطريقــة طبيعيــة ،لأنهـا لا تصـــنع الهرمون،والأنسولين البشري**human insulin** الذى يحتاجـــه مرضــــى البـــول السكرى الذين لم يعد باستطاعتهم تعاطى الأنسولين البقـــري **bovine insulin** ، لأنه أصبح لديهم حساسية ضد هذا العقار، وتصنع الهرمونات بوضع الجينـــات البشرية فى خلايا بكتيرية أو خلايا أخرى تنمو فى مزرعة المعمـــل ، والتـــى يمكن أن تستخدم حينئذ كمصانع حية لهذه المنتجات، ومن البروتينات البشـــرية الأخرى المهمة طبياً،والتى يجـــرى إنتاجهـــا بهـــذا الأســـلوب،الأنترفيرونات **interferons**،والأنترليوكينات**interleukins**، ويختبر كـــلا المنتجـــين لعـــلاج السرطان.

إسهامات تشارلز داروين وجريجور مندل

The contributions of Charles Darwin and Gregor Mendel

وعلى الرغم من أن معظم المعلومات التى جعلت هذه التطورات ممكنة قـــد أمكن التوصل إليها خلال الأربعين عاماً الماضية، إلا أن القصة بدأت فعلا منذ أكثر من مائة وعشرين عاماً مضت، من خلال الأبحاث المستقلة التى قام بهـــا كـــل مـــن تشـــارلز دارويـــن (١٨٠٩-١٨٨٢) (شـــكل ١-١) وجريجـــور مندل(١٨٢٢-١٨٨٤). فالإسهامات التى قام بها داروين، والتى نـــال بفضـــلها جورج جيلورد سيمبسون**George Gaylord Simpson** تقديراً مباشراً لكونه أبـــا البيولوجيا الحديثة، ولو أن هذا التقدير لم يكن طيباً دائماً.



شكل١-١. تشارلز داروين، العالم الطبيعى البريطانى،الذى قدمت ملاحظاته المستفيضة عن العالم الطبيعى الدعامات الأساسية لنظريـة التطور.

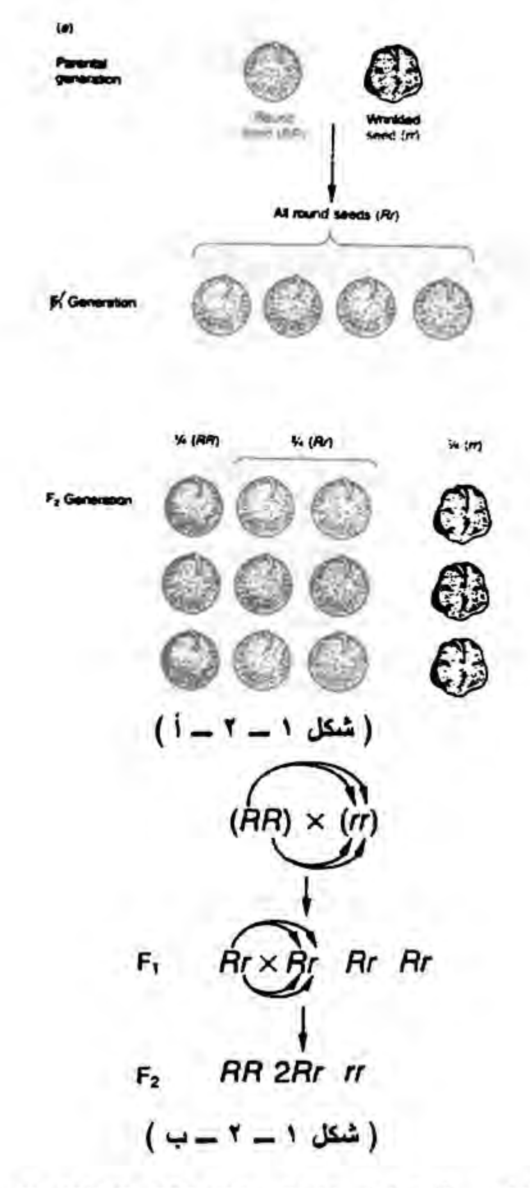
كان داروين عالم الطبيعة، الذى قام بملاحظات مستفيضة ومنظمة عن نباتات وحيوانات العالم، قد توصل من خلال البيانات التى حصل عليها بنفسه ومـن الآخرين إلى نتيجَة هى أن الأنواع ليست ثابتة ولا تتغير ، لكنها تتطـور مـع الزمن لإنتاج أنواع جديدة، بالإضافة إلى ذلك، قدم داروين تفسيرا محتملاً عـن كيفية حدوث هذا التطور. فقد لاحظ أن أفراد نوع من الأنواع، تبدى قدرا كبيرا من التغير، وافترض أن البعض منها يكون ملائماً للبيئة التى يتواجد بها أكثـر من الأنواع الأخرى، وبناء على ذلك، ينتج الأفراد الأكثر ملائمة مع البيئة ذرية أكبر من الأفراد الأقل ملائمة مع البيئة، وفى النهاية، سوف تحدث هذه العمليـة والتى أطلق عليها داروين الانتخاب الطبيعى تغيرا فى صفات مجموعـة مـن الكائنات، حيث تبقى وتنتشر الصفات التى فضلت البقاء والتكاثر، بينما تصـبح الصفات الأقل تفضيلاً أقل شيوعاً أو تنقرض . ويحدث ما يشبه ذلك فى تربيـة النباتات أو الحيوانات،على الرغم من أن المربى على عكس الطبيعة، تكون لديه القدرة على اختيار الصفات التى يرغب فى الاحتفاظ بها، وعلى الرغم مـن أن العلماء لا يزالون حتى اليوم يجادلون فيما إذا كان التطور يـتم عـن طريـق

الاختيار الطبيعى، كما افترض داروين، إلا أنهم لا يجادلون فى أن الأنواع تتطور.

وقد نشر داروين ملاحظاته واستنتاجاته لأول مرة عام ١٨٥٩، فى كتاب باسم "فى أصل الأنواع عن طريق الاختيار الطبيعى،أو بقاء الأنواع المفضلة فى الكفاح من أجل الحياة"، وقد نال الكتاب شهرة كبيرة، وأصبح من أكثر الكتب رواجاً فى ذلك الحين، على الرغم من الجدل الكبير الذى دار حوله بخصوص ما ذكره عن أن الإنسان قد تطور عن بعض صور أخرى من الحياة.

وفى نفس الوقت الذى كان يتمتع فيه داروين بالشهرة التى حظى بها نتيجة أبحاثه،كان الراهب جريجور مندل يعمل منعزلاً فى حدائق الدير بمدينة برنو، التى تقع ضمن إقليم مورافيا، الذى كان تابعا فى ذلك الوقت للنمسا، لكنه الآن جزء من تشيكوسلوفاكيا.

كشفت أبحاث مندل عن القوانين الأساسية التى تحكم الوراثة، وقد قام بهذا أثناء إجرائه تجارب تربية لنبات بازلاء الحديقة، وقام فى إحدى تجاربه بتهجين نباتات البازلاء التى لا تنتج عادة إلا بذوراً ملساء مستديرة مع نباتات لا تنتج إلا بذورا مجعدة، وجاءت نتيجة التزاوج بذرية من البذور جميعها ملساء، حيث اختفت صفة تجعد البذور من نباتات الجيل الأول (انظر شكل ١-٢).



(شكل ١ ـ ٢ ـ أ)

(شكل ١ ـ ٢ ـ ب)

شكل١-٢ ـ أ الوراثة فى البازلاء. (أ) عندما قام مندل بتزويج نباتات البازلاء التى لا تنتج إلا بذورا مستديرة مع نباتات بازلاء لا تنتج إلا بذوراً مجعدة، أعطت جميع نباتات الجيل الأول(ج١) بذورا مستديرة ، لأن صفة "الاستدارة" كانت الصفة السائدة على صفة"التجعد". ومع ذلك، ، فقد احتفظت نباتات البازلاء(ج١) بجين صفة التجعد المتنحى،وعندما قام بتزويج هذه النباتات مع بعضها البعض مرة أخرى، أنتجت ٤/١ نباتات الجيل الثانى (ج٢) بذورا مجعدة.

ب ـ سلوك الجينات المشفرة عن الصفات السائدة المستديرة والصفات المجعدة المتنحية، النباتات الأم حقيقية التربية، لها إما جينان للصفة المستديرة (م م)أو جينان للصفة المجعدة(م١ م١) وعندما يجرى تزويج هذه النباتات، فستصبح كل الذرية (م م١)، ونتيجة لذلك لا تنتج إلا بذورا مستديرة ، ومع ذلك . فعندما يتم تزويج نباتان (م م١)، فسوف يتحد الجينان كما هو موضح بالشكل ليعطيا نبات (م م) ونبات (م١ م١) لكل اثنين من نوع (م م١). وعلى ذلك ، تنتج ٤/٣ هذه الذرية بذورا مستديرة ، وتنتج ٤/١ النباتات بذورا مجعدة.

ثم مضى مندل فى تزويج نباتات الجيل الأول مع بعضها البعض، وكـــان لا يزال ثلاثة أرباع الجيل الثانى الناتج ينتج بذوراً ملساء، بينما أصـــبحت بـــذور الربع الباقى مرة أخرى مجعدة ، فالصفة التى لم تظهر فى الجيل الأول، عادت وظهرت فى الجيل الثانى، وأظهرت نتائج تجارب تربية مشابهة ، أن صـــفات أخرى مثل اللون، تتخذ نفس الأسلوب.

علاوة على ذلك، عندما تتبع مندل وراثة صفتين مختلفتين فى نفس الوقـــت، وجد أنهما يمكن أن يورثا بصورة مستقلة من إحداهما للأخرى، فعنـــدما زاوج نباتات تنتج بذوراً صفراء وملساء مع نباتات تنتج بذوراً خضراء ومجعدة، أنتج نباتات فى الجيل الأول لا تعطى إلا بذوراً صفراء وملساء ، ومع ذلك، فنباتات الجيل الثانى لم تعط فقط بازلاء بمجموعة الصفتين الأصليتين، لكنهـــا أنتجـــت أيضاً بعض نباتات البازلاء بمجموعات جديدة من الصـــفات مجعـــدة صـــفراء وملساء خضراء.

استنتج مندل من هذه النتائج،أن الصفات الوراثية تحمل وتنقل إلى الذرية فى صورة وحدات مستقلة، وفى واقع الأمر ، فقد وضـــع منـــدل أصـــول مفهـــوم "الجين"،على الرغم من أن هذا المصطلح لم يستخدم إلا فى أوائل عـــام ١٩٠٠، وقد توصل مندل من التجارب أيضاً إلى أن كل فرد يحمل نسختين من كل صفة ، لكنه لا يورث إلا نسخة واحدة لكل ذرية، والأكثر من ذلك، فإن بعض الصور الأخرى من صفة معينة تكون صفات سائدة على الصفات الأخرى، فإذا ورثتـــا معاً ، تظهر الصفة السائدة بينما لا تظهر الصفة الأخرى المتنحية .

أوضحت هذه الفروض بشكل كامل الأنماط الوراثية فى نبات البازلاء، وعلى سبيل المثال،فقد كانت للنباتات ذات البذور الملساء الأصلية وحـــدتان تحـــددان صفة "أملس " وكانت للنباتات ذات البذور المجعـــدة وحـــدتان تحـــددان صـــفة "المجعد"، بعد ذلك ورثت ذرية التزاوج الأول صفة من كل منهما، ونتيجـــة أن كل نباتات البازلاء كانت ملساء ، تعنى أن هذه الصفة كانت سائدة على الصـــفة المتنحية. وعلى الرغم من ذلك، فإن الوحدة التى تحدد صفة التجعد لم تفقد، بل ظلت كامنة، ويمكن أن تظهر مرة أخرى فى ذرية التزاوج الثانى، عندماُ تزّوج معاً وحدتى الوراثة اللتن تحملان صفة مجعد .فى عام ١٨٦٥نشر مندل نتـــائج أبحاثه فى مجلة "جمعية برنو للعلوم الطبيعية"، لكنها ظلت محتجبة لفترة طويلة ، وحتى داروين نفسه لم يتعرف عليها ، على الرغم من أنها كانت منصبة بشكل مباشر فى صميم أبحاثه، وتعتبر وحدات الوراثة التى وصفها مندل المادة الخام للتغير الذى يتأثر بالاختيار الطبيعى، وفى النهاية أعاد هوجو دى فريز **Hugo de Varies** وكارل كورنز**Carl Correns** اكتشاف أبحاث مندل فى أوائل هذا القرن ، حيث كانا يقومان بتجارب تربية مماثلة، وفى تلك الفترة تقريبـــاً، أصـــبحت تعرف وحدة الوراثة الأساسية بالجين، وأصبح علم الوراثة(**Heredity**) يعـــرف بـــــ"**genetics**".

التعرف على أن الـــ د.ن.أ هو مادة الوراثة

The identification of the genetic material as DNA

على الرغم من أن مندل وصف السلوك الأساسى للجينات، إلا أن تجاربه لم تكشف عن الطبيعة الكيميائية لوحدات الوراثة، ولم يحدث ذلك إلا فى أواسط هذا القرن،غير أن الموقع المحتمل للجينات أصبح معروفاً قبل ذلك بفترة طويلة .

ففى ثلاثينات القرن الماضى، أدرك كل مــن ثيــودور شــفان[2] وماتيـــاس شلايدن[3] بصورة مستقلة ، أن جميع الكائنات الحية تتكون من خلايا؛ فالبكتيريا التى تعتبر من أصغر وأكثر الكائنات العضوية بدائية، لا تحتوى إلا على خليـــة واحدة، بينما تحتوى كائنات عضوية بالغة التعقيد كالإنســان علـــى مليـــارات الخلايا.

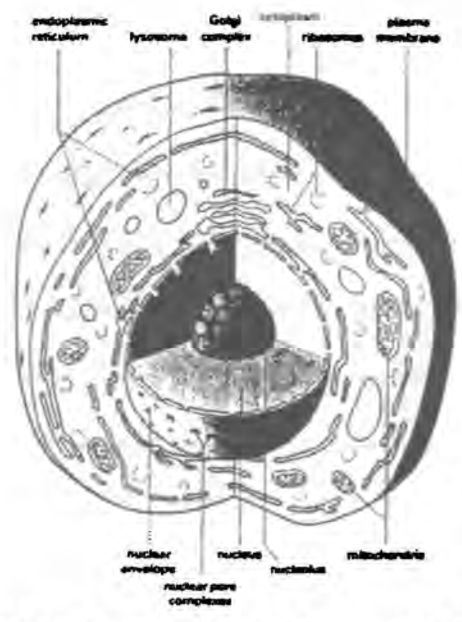
وعندما اكتشفت الخلايا لأول مرة بواسطة أجهــزة ميكروســكوب بدائيـــة، ظهرت فى صورة أكياس بسيطة مملوءة بسائل، ولما تطورت الميكروسكوبات، أدرك العلماء أن للخلايا تركيبات داخلية معقدة(شكل ١-٣)، والسمة البارزة فـــى هذه التركيبات هى النواة، وجميع خلايا الكائنات العضوية الراقية الأخرى، التى تشمل النباتات والحيوانات، وحتى بعض الكائنات البســيطة جــداً، كـــالخميرة والأميبا تحتوى على نوى ، وخلية نبات أو حيوان مثالية يصل قطرها حـــوالى ٢٠ميكرومتراً (الميكرومتر هو جزء من ألف جزء من المليمتر)، ويبلغ قطـــر

---

٢ ــ ثيودور شفان(١٨١٠-١٨٨٢): عالم فيسيولوجي ألماني. يعتبر أحد مؤسسي علم الخلايا. (المترجم.[2])

٣ ــ إنشـــاء علم - ماتيياس جاكوب شلايدن(١٨٠٤-١٨٨١): عالم نبات ألماني. أسهم إسهاما بارزا في الخلايا. (المترجم.[3])

النواة نفسها حوالى خمسة ميكرومترات، وتسمى الكائنات العضوية التى تحتوى خلاياها على نوى بالخلايا سوية النواة **Eukaryotes**، والخلايا الوحيدة التى لا يوجد بها نوى هى خلايا البكتيريا وبعض أشكال الطحالب البدائية ، ويبلغ قطر بكتير نموذجى قضيبى الشكل حوالى ٠,٥ميكرمتـــر، ويصـــل طولـــه بضـــعة ميكرومترات، حيث يعتبر إلى حد ما أصغر مـــن النـــواة، وتســـمى الكائنـــات العضوية التى لا توجد بخلاياها نوى بالخلايا بدائية النواة **prokaryotes** .



شكل(١-٣) مخطط لخلية حيوانية "نموذجية"، يوضح تركيبها الداخلى المعقد، والسمة الداخلية الواضحة تماما هى النواة،التى تحتـــوى على المادة الوراثية، ويلاحظ فى النواة أيضا واحدا أو أكثر من التركيبات المسماة بــــالنويات(جمع نوية) ، حيث يخلق الـــر.ن.أ الريبوسومى ، ويتحد مع البروتينات الريبوسومية، وتحاط النواة بغلاف غشائى ذى مسلم يسمح بمرور جزيئات كبيرة بين النـــواة و السيتوبلازم ، والجسيمات الريبية، وهى مواقع تخليق البروتين، إما أن تكون حرة فى السيتوبلازم، أو مرتبطـــة بأغشـــية الشـــبكة الهيولية الباطنة . وتنتقل البر وتينات المخلقة حديثا فى صورة حويصلات من الشبكة الهيولية الباطنة إلى مجمع جوجلى،الذى يظهر فى الصور الميكروسكوبية الإلكترونية فى شكل كومة من الأقراص الغشائية المفلطحة، ويطرأ على مجمع جوجلى سلســـة مـــن تفـــاعلات الإنضاج، مثل إضافة السكريات.

وبالرغم من حدوث بعض التفاعلات المنتجة للطاقة فى السيتوبلازم، إلا أن معظم طاقة الخلية تأتى من التفاعلات التـــى تحـــدث فـــى الميتوكوندريا، والتى تسمى أحيانا "بمخازن طاقة الخلية". وتحتوى الجسيمات الحالة على الإنزيمات التى تحلل(تهدم) الأنقاض الخلويـــة والجزيئات الكبيرة ، مثل البروتينات ، التى أ دخلت الخلية، ويحيط بالخلية الغشاء البلازمى،الذى يساعد على الحفاظ على البيئة الطبيعية الداخلية عن طريق الاحتفاظ بالمواد الغذائية المطلوبة،واستبعاد النفايات، ولا يظهر بالمخطط الخيوط البروتينية والأنبوبية العديدة التى تحتاجها الخلية لكى تتحرك ، ولكى تحتفظ بشكلها.

تحتوى النوى على مادة تسمى صبغين[٤] **chromatin**، لأنها تصبح سـريعة الانصباغ عندما تصبغ الخلايا بصبغات معينة، وينتظم الصبغين فـي صـورة أشكال شبيهة بالخيوط تسمى صبغيات (كروموسومات) **chromosomes**، ويكون عددها المضبوط ثابتاً فى جميـع أفـراد أى نـوع مـن الكائنـات، وتظهـر الكروموسومات فى صورة أزواج فى كل خلية من الخلايا سليمة النواة ، ما عدا الخلايا الجرثومية التى تتكون من بويضة وحيوان منوى، وتحتوى خلايا الإنسان على ثلاثة وعشرين زوجاً من الكروموسومات، أو ما مجموعه ستة وأربعـون كروموسوماً ، بينما لا تحتوى خلايا ذبابة الفاكهة المسـتخدمة فـى التجـارب المعملية إلا على أربعة أزواج فقط من الكروموسومات.

وعندما تنقسم معظم الخلايا أثناء عملية تسمى بالانقسام الفتيلي**mitosis**،فـإن الكروموسومات تتضاعف أولاً وبعد ذلك تنقسم ،بحيث تتلقى كل من الخليتـين الوليدتين مجموعة كاملة من الكرموموسومات المزدوجة، وهى الستة والأربعون كروموسوماً فى حالة الخلية البشرية، فى حين تجرى انقسامات الخلية التى تنتج الخلايا الجرثومية بطريقة ما بحيث تستقبل كل بويضة أو حيوان منوى

وبمجرد أن أعيد اكتشاف أبحاث مندل،أصبح من السهل ملاحظة أن سلوك الكروموسومات يتطابق مع سلوك وحدات الوراثة لمندل ،فقد اقترح أن أى كائن عضوى يحمل وحدتين من كل صفة معينة، وتبعاً لذلك تحتوى خلايا الجسم الطبيعى دائماً على نسختين من كل كروموسوم، وعلاوة على ذلك، تتضمن نظرية مندل على أن كل من الأب والأم ينقلان وحدة واحدة فقط من الوحدات المزدوجة من كل صفة،لابنته أو ابنه ، وتحتوى الخلايا الجرثومية على كروموسوم واحد من كل زوج كروموسومى.

- وعلى الرغم من التثبت من أن الكروموسومات هى الموقع المحتمل لمادة الوراثة، فلم يكن معروفاً سوى النذر اليسير عن الطبيعة الكيميائية للجينات أو تكاد تكون غير معروفة بالمرة، ولا كيف يمكن أن تترجم المعلومات التى تحتوى عليها إلى سمة ملحوظة، مثل لون بذرة البازلاء.

اكتشاف الـ د.ن.أ
The discovery of DNA

تتكون الكروموسومات غالباً من بروتينيات وأحماض نووية، والتى قام باكتشافها فردريك ميشر **Friedrich Miescher** فى ستينات القرن الماضى، الذى عزل المادة من نوى الخلايا، ويبدو أن البروتينات وهى أحد نوعى المادة البيولوجية المادة الأكثر احتمالاً لأن تكون مادة الوراثة، ذلك الاعتقاد الذى ظل سائداً حتى عام ١٩٥٠ ، وبعد ذلك الحين أصبح غير مقبولا،

ولم تحظ الأحماض النووية **Nucleic acids** بأهمية كبيرة ، ويرجع السبب فى ذلك إلى الاعتقاد بأنها كانت من الصغر وبساطة التركيب بحيث لا يمكنها أن

تشفر عن المعلومات الوراثية؛ فالحمض النووى يتكون من وصل وحدات بنائية ببعضها البعض، تسمى نكليوتيدات **nucleotides** (نوويدات)، ويتكون النكليوتيد من سكر يرتبط به مجموعة فوسفات، وقاعدة من القواعد الأربع، ويعتبر السكر بالنسبة للأحماض النووية الكروموسومية ريبوزاً منقوص الأكسجين ، ومن ثـم جاءت تسمية الحامض بالحامض النووى الريبى المنقوص الأكسجين (**DNA**)، والقواعد الأربع هى:الأدنين**adenine**، والثايامين**thymine**،والسيتوسين**cytosine** ، والجوانين **guanosine** (شكل ١-٤).

وأمّا موضوع الحجم فقد حل بنفسه تماماً،عندما أدرك المتخصصـون فـى البيولوجيا الجزيئية،أن الأوزان الجزيئية المنخفضة ظاهرياً،التى تم اكتشافها فى عينات الـــ د.ن.أ الأولى قد نتجت كذلك لأن المادة تتحلل أثناء عزلها، وفـى الواقع ، فإن جزيئيات الـــ د.ن .أ الخلوية، تعتبر جزيئات كبيرة جـداً، ولهـا أوزان جزيئية **molecular weights** تصل إلى الملايـين أو حتـى مليـارات. وبالرغم من وضوح هذه الحقيقة، إلا أن هناك اعتقاداً خاطئاً آخر ظل يعمل ضد احتمال أن تكون الجينات مصنوعة من الــ د.ن.أ. واعتقـد علمـاء الكيميـاء الحيوية بصفة عامة،أن جزيئات الحمض النووى الكبيرة، كانت تتكون ببسـاطة من تكرار تسلسل النكليوتيدات الأربعة ذاته المرة تلو المرة ، ومن الصـعب أن يحمل جزيء له هذا التركيب الثابت الرتيب معلومات يتطلبها صـنع فـأر أو إنسان.

وفى مقابل ذلك، فللبروتينات أشكال غاية فى التعقيد، وهى أيضـاً جزيئـات كبيرة،ولها أوزان جزيئية تصل من عشرات إلى مئـات الآلاف، وأيضـا مـن ترابط وحدات بنائية بسيطة معاً، وهى فى هذه الحالة الأحماض الأمينية **amino**

acids. وتحتوى البروتينات على عشرين حمضاً أمينيــاً مختلفــاً فــى مقابــل الوحدات البنائية النكليوتيدية الأربع المكونة للـــ د.ن.أ، ويلاحـــظ أن تركيـــب البروتينات المختلفة يمكن أن يكون متنوعاً.

وعلاوة على ذلك،تلعب البروتينات دوراً ديناميكياً مهماً فى حياة الخلية، فهى المكونات البنائية الرئيسة للأجزاء العديدة من التركيب الخلوى الداخلى للكائنات، وبالإضافة إلى ذلك، فهى تعتبر إنزيمات**enzymes**، تلك الحافزات البيولوجيــة التى تقوم بإجراء العديد من التفاعلات الكيميائية،التى تحصل من خلالها الخليــة على النمو والطاقة.فى فترة الأربعينات، وجد الباحثون أن الجينات تقوم بعمليــة توجيه تخليق البروتينات، ومن بين المشاركين الرئيسين فى هذا البحث ،جورج بيدل**George Beadle** وإدوارد تاتيوم**Edward Tatum**، اللذان تضمنت أبحاثهما فى الغالب كائنات عضوية بسيطة،مثل ذباب الفاكهة،والفطر والبكتيريا.

والطفرات**Mutations**،هى تغيرات فى الجينات، تؤدى إلى تغيير خصـــائص الكائن العضوى بشكل واضح، فقد تغير الطفرة لون عين ذبابة الفاكهـــة، علـــى سبيل المثال، وقد تغير الطفرات أيضاً من المتطلبات الغذائية لكائن عضوى، إذ تجعله يعتمد على نوع معين من الغذاء لم يكن يحتاجه الكائن العضـــوى الأب، وعلى أية حال، فقد أوضح بيدل **George Beadle** وتاتيوم **Edward Tatum**أن الطفرات الفردية فى بعض البكتيريا والفطريات،ترتبط بفقد إنزيمات معينة مـــن كائنات الاختبار العضوية .

وجاء لينوس بولينج[٥] **Linus Pauling**(١٩٠١-) بدليل آخر على أن الجينات توجه عملية تخليق البروتينات، وهو الذى حدد العيب الجزيئى الذى يسبب أنيميا الخلية المنجلية **sickle cell anaemia**، ذلك المرض الوراثى البشرى،الذى تظهر فيه خلايا الدم الحمراء هشة جدا وعرضة للتلف، وتحتوى خلايا الدم الحمـــراء على بروتين الهيموجلوبين الذى يمكنها من نقل الأكسجين إلى أنسجة الجسم، وقد أوضح بولنج وزملاؤه أن الهيموجلوبين فى مرضى أنيميا الخلية المنجلية،يختلف من حيث التركيب عن هيموجلوبين الأفراد العاديين ، وبمعنى آخر، أن الجـــين الطافر الذى يسبب أنيميا الخلية المنجلية، هو الذى يوجه تخليق بروتين متغير.

وأثارت هذه النتائج سؤالاً فلسفياً مهماً: إذا كانت الجينات توجـــه تخليـــق البروتين،فهل من الممكن أن تكون هى نفسها بروتينات؟ بيد أنه فـــى منتصـــف الأربعينات،بدأت الأبحاث تستبعد فكرة أن تكون البروتينات هى المادة الوراثيـــة **genetic material** وبدأت تتجه نحو الـــ د.ن.أ. وجاءت أحد الأدلـــة المهمـــة المقنعة عن طريق أوزوالد أفـــري**Oswald Avery**،وكـــولين مـــاكليود **Colin MaLeod** وماكلين ماكارتي**Maclyn McCarty**، الذين كانوا يعملون باحثين فى معهد روكفلر بمدينة نيويورك**Rockefeller Institute**، (ويسمى المعهـــد حاليـــاً بجامعة روكفلر **Rockefeller University**).

وقد وضعت دراسات فرد جريفيث **Fred Griffith** الأساس الذى بنوا عليه أباحثهم،وهى التى أجراها فى فترة العشرينات عـــن بكتيريـــا ســـتربتوكوكس

٥ــ لينوس بولينج(كارل) (١٩٠١-): كيميائي أمريكي، ولد في بورتلاند، وقد قام بتطبيق نظرية الكـــم علـــى الكيمياء، وحصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام ١٩٥٤،لإسهاماته في نظرية التكافؤ، و حصل على جـــائزة نوبل في السلام عام ١٩٦٢،ويعتبر الشخص الوحيد الذي حصل على جائزتي نوبل كاملتين.

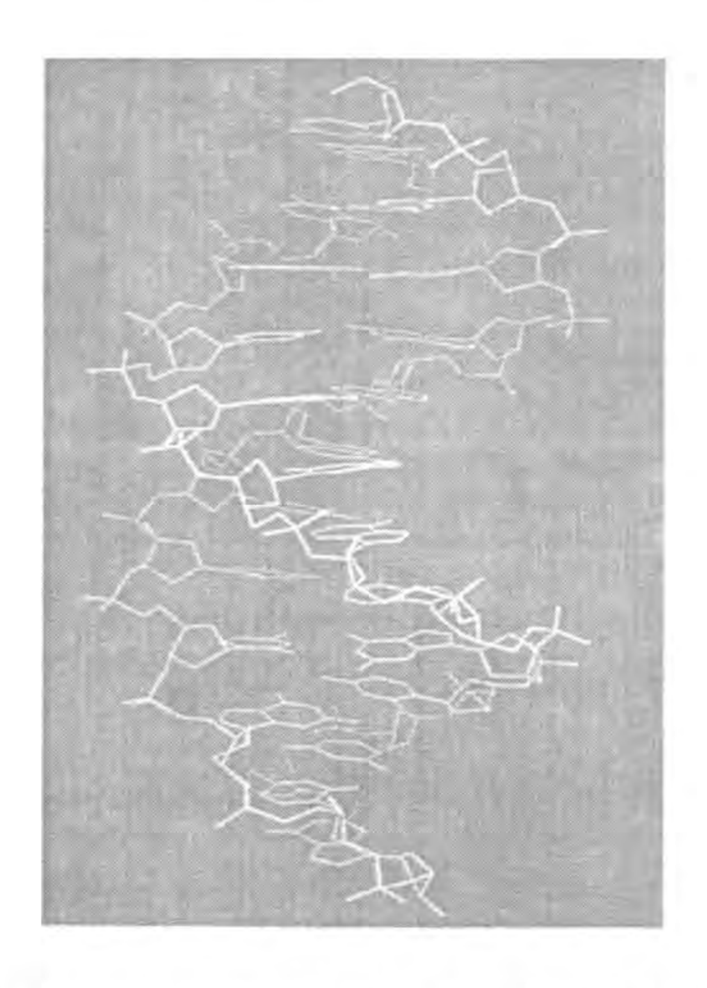
بنيومونيــا(Streptococcus pneumoniae) ، التـــى تســـبب مـــرض التهـــاب الرئةpneumonia فى البشر، وشديدة الفتك بالفئران، وإحدى الصـــور شـــديدة الخطورة لهذه البكتيريا، إنتاج مستعمرات خشنة الأسطح عندما تنمو على أطباق المزرعة، والصورة الأخرى التى لا تسبب التهاب الرئة، تنتج مستعمرات ناعمة الأسطح. واكتشف جريفيث أن الفئران التى حقنت بمزيج من بكتيريا المستعمرة الخشنة الميتة وبكتريا مستعمرة ناعمة حية، قد مرضت علـــى الـــرغم مـــن أن البكتريا الميتة لا تسبب المرض عندما تحقن بمفردها، وجاءت النتيجة،أن بعض عناصر بكتيريا المستعمرة الخشـــنة قـــد انتقلـــت إلـــى بكتيريـــا المســـتعمرة الناعمة،وبذلك جعلتها بكتيريا خبيثة، وقد فسر أفرى و ماكلويد وماكارتى أن هذا المركب ،هو الـــــ د.ن.أ . وهذا الاكتشاف بأن الـــــ د.ن.أ يمكنـــه أن ينقـــل معلومات وراثية بين الأنواع البكتيرية،أصبح يعرف بمفاجأة أفـــرى المذهلـــة ، بسبب تأثيره المدوى الذى أثر به فى ذلك الحين على علم الأجنة فى البيولوجيا الجزيئية.

Purine nucleotides

Pyrimidine nucleotides

شكل ١-٤ وحدات البناء النكليوتيدية للـــــ د.ن.أ . يتكون كل نكليوتيد من مركب سكر،وهو هنا منقوص الأكسجين (الذى يظهـــر فـــي صورة حلقة،ذات ذرات كربون مرقمة من واحد إلى خمسة)، و له مجموعة فوسفات(ذرة فوسفور مرتبط بها أربع ذرات أكسجين)مرتبطة بذرة الكربون رقم ٥،وقاعدة تحتوى على النتروجين،ترتبط بذرة الكربون رقم ١. وتشمل القواعد الأربـــع الموجـــودة فـــي د.ن.أ علـــى قاعدتين بورين(أدنين وجوانين)، وعلى قاعدتين بريميدين(ثيامين وسيتوسين). والوحدات البنائية النكليوتيديـــة لأحمـــاض ر.ن.أ لهـــا وحدات بنائية مماثلة،فيماعدا أن السكر يكون ريبوز، ولها مجموعة هيدروكسيل(OH-) على ذرة الكربون رقم ٢،ويســـتبدل الثـــايمين بـــــ يوراسيل،وهى قاعدة-برميدينية أخرى.

شكل(١ - ٥ ـ أ) تركيب الـــ د.ن.أ . تتكون جزيئات الـــ د.ن.أ من ربط الأكسجين الموجود فى مجموعة الفوسفات فى أحد النكليوتيدات بذرة الكربون رقم ٣ الموجودة ب الدى أكسى ريبوز فى النكليوتيد الثانى فى السلسلة(أ). وهذا ينتج جزيء يتكون من عمود فقرى ذى مجموعة فوسفات مع مجموعات دى أكسى ريبوزات متبادلة مع قواعد بارزة، وعلى الرغم من أن المخطط البيانى يوضح د.ن.أ يحتوى فقط على أربع نكليوتيدات، فيمكن ان تحتوى سلاسل الـــ د.ن.أ المكونة من الجينات على ملث النكليوتيدات، وتتكون جزيئات الـــ ر.ن.أ بطريقة مماثلة.



شكل(١- ٥ ــ ب) ويظهر فى جزيء الـــ د.ن.أ الكامل سلسلتان متصلتان معا تكونان حلزونا مزدوجا،ويظهر شكله المعتاد الـذى على صورة حرف B فى المخطط(ب). والعمود الفقرى المكون من الفوسفات-دى أكسى ريبوز لكل سلسلة يظهر من الخارج، وتوجـد القواعد فى الداخل من الحلزون المزدوج، وتتزاوج قواعد السلسلة الأولى مع قواعد السلسلة الأخرى تبعا لقواعد شار جـاف: تـرتبط قواعد الأدنين دائما مع قواعد الثيامين،وقواعد الجوانين مع قواعد السيتوسين. ومن خلال مظهر الـــ د.ن.أ هــذا، يـرى أن لمعظـم القواعد أفضلية.

وبعد ذلك، لاحظ أروين شارجاف **Erwin Chargaff** فى أوائل الخمسينات، بعض أوجه الانتظام فى تكوينات القواعد التى تتركب منها جزيئات الـــ د.ن.أ من أنواع مختلفة،والتى أعطت المدخل الأساسى لحل لغز تركيب المادة، وعلى وجه الخصوص، كانت نسبة الأدنين دائماً تساوى نسبة الثيامين، وكانت نسـبة

الجوانين دائماً تساوى نسبة السيتوسين، وعلى الرغم من ذلك ، فقد كانت تتفاوت نسبة زوج الأدنين–ثيامين لزوج الجوانين–سيتوسين تفاوتاً كبيراً من نوع لآخر.

وقد دحضت هذه الملاحظة الأخيرة فرضية أن الـــــ د.ن.أ يتكـــون مـــن وحدة متكررة رتيبـــة مـــن نكليوتيـــدات أربـــع، وإذا كانـــت هـــذه الفرضـــية صحيحة،فيجب أن تكون القواعد الأربع وهى الأدنين والسيتوسين والجـــوانين والثيامين موجودة بكميات متساوية، غير أن هذا كان من الواضح مخالفـــاً لمـــا اكتشفه شارجاف . واقترح البحث أن تركيب الـــ د.ن.أ قد يكون له رغم كل شيء، التنوع المطلوب لأن يكون مستودع للمعلومات الوراثيـــة.وفـــى أوائـــل الخمســـينات أيضـــاً،فإن جـــيمس واتســـون**James D. Watson** وفرنســـيس كريك**Francis Crick** اللذين كانا يعملان معاً فى ذلك الحين فى معمل مجلـــس الأبحـــاث الطبيـــة للبيولوجيـــا الجزيئيـــة **Medical Research Council's Laboratory of Molecular Biology** فى كمبردج بـــإنجلترا، يحـــاولان حـــل تركيب جزيء الـــ د.ن.أ الثلاثى الأبعاد بواسطة طرق التصـــوير البلـــورى بالأشعة السينية **X-ray crystallographic methods**.

وفى التصوير البلورى بالأشعة السينية ،تسقط حزمة من أشعة أكـــس علـــى بلورة نقية من المادة الجارى دراستها، وتفرق البلورة أو تشتت الأشعة الســـينية بطريقة ما تتوقف على التركيب الثلاثى الأبعاد للجزيء، ويمكن تســـجيل نمـــط الأشعة السينية المتفرقة على فيلم تصويرى ،ومنه يمكن إعادة إنشـــاء تركيـــب الـــــ د.ن.أ ، بطرق رياضية معقدة.

وقد خاض واطسون وكريك تجربة أو تجربتين فاشلتين خـــلال جهودهمـــا لاستنتاج تركيب الـــــ د.ن.أ، قبل أن تقدم لهما صورة الأشعة السينية المفرقة ، التى ابتكرها روسالند فـــرانكلين**Rosalind Franklin** فـــى معمـــل مـــوريس ويلكنز**Maurice Wilkins' laboratory** بكمبردج خدمـــة جليلـــة، وباســـتخدام المعلومات المحتواة فى الصورة المفرقة، والاستعانة بقواعد شارجاف،اســـتطاع واطسون وكريك التوصل إلى أن جزيء الــــــ د.ن.أ يتكـــون مـــن سلســـلتين مستقلتين من النكليوتيدات الملفوفـــة حـــول بعضـــها فـــى صـــورة حلـــزون مزدوج(شكل ١-٥)، وتتكون كل سلسلة من عمود فقرى تتبادل عليه نكليوتيدات الفوسفاتات والريبوزات المنقوصة الأكسجين، وتبرز القواعد من العمود الفقرى.

ويقع العمودان الفقريان للسلسلتين جهة الخارج فى حلزون واطسون-كريـــك المزدوج،بينما تقع القواعد داخل العمودين الفقـــريين. وتكـــون قواعـــد إحـــدى السلسلتين روابط هيدروجينية ضعيفة مع قواعد السلسلة الأخرى بطريقة محددة تماماً، وتبعاً لقوانين شارجاف، ترتبط قواعد الأدنين على الدوام بقواعد الثيامين، وترتبط قواعد السيتوسين على الدوام بقواعد الجوانين.

ويقدم التصميم الجزيئى للــــ د.ن.أ وسيلة للاحتفاظ بالمعلومـــات الوراثيـــة ونقلها للأجيال القادمة، وتعد الجزيئات من الكبر بحيث يمكنها أن تسفر عن قدر كبير من المعلومات فى تسلسلانها النكليوتيدية، وعلاوة على ذلك، يمكن التعرف على التسلسل النكليوتيدى لإحدى السلسلتين عن طريق التسلسل الآخر.

وقبل أن تنقسم خلية، يجب أن تتضاعف مادتها الوراثية،بحيث ترث كل خلية وليدة نسخة مضبوطة وكاملة، ولكى يتضـــاعف الـــــــ د.ن.أ حينئـــذ، فـــإن الجديلتين تنفصلان،وتعمل كـــل واحـــدة منهمـــا كنمـــوذج أو نمـــط لتخليـــق

الأخرى(شكل ١-٦). ووفقاً لقوانين الازدواج القاعدى، فإن قواعد الأدنين ترتبط مع قواعد الثيامين، وترتبط قواعد الجوانين مع قواعد السيتوسين، بحيث ينـتج جزيئى الجديلة المزدوجة، اللذين كلاً منهما نسخة مطابقة من تركيـب الــ د.ن.أ الأصلى، وترث كل خلية وليدة إحدى النسختين.

وقد يبدو من النظرة الأولى ،إن هناك مشكلة كبيرة فى فكرة أن يكون الــ د.ن.أ هو المادة الوراثية، فالــ د.ن.أ ليس له سوى أربع قواعد بنائية، غيـر أنه يجب أن يوجه تخليق البروتينات،التى تتكون من عشـرين حمضـاً أمينيـاً مختلفاً، ومع ذلك، فلا يعتبر هذا مشكلة فى الحقيقة ،لأن كل مجموعة مكونة من ثلاث نكليوتيدات تحدد حمضاً أمينياً معيناً، ويمكن أن تعطى أربعة نكليوتيـدات ٦٤ مجموعة(مضروب الرقم ٤)،عندما تجمع فـى صـورة ثلاثيـات٣٤ =٦٤ مجموعة، وهى أكثر من اللازم لتحديد عشرين حمضاً أمينياً.

وفى فترة الستينات، أجريت دراسة مستفيضة على الشفرة الوراثيـة **genetic code**،من خلال الجهود التى قام بها كل من هار كوبند خورانـا **Har Kobind Khorana**، ومارشال نيرنبرج**Marshall Nirenberg**، وسيفيرو أوشوا **Severo Ochoa**، الذين أوجدوا طرقاً لتحديد أى تسلسل ثلاثى نكليوتيدى أو كودون- كما جرى العرف على تسمية التسلسلات- يناظر أى حمض أمينى، واتضح لهم أن معظم الأحماض الأمينية يمكن أن تمثل بأكثر مـن كـودون واحـد، وجميـع

سهلة، ولكن العكس ليس صحيحاً. فالحمض الأمينـــى **Leucine**، علـــى ســـبيل المثال، يمكن أن يمثل فى جين بأى كودون من ستة كودونات مختلفة.

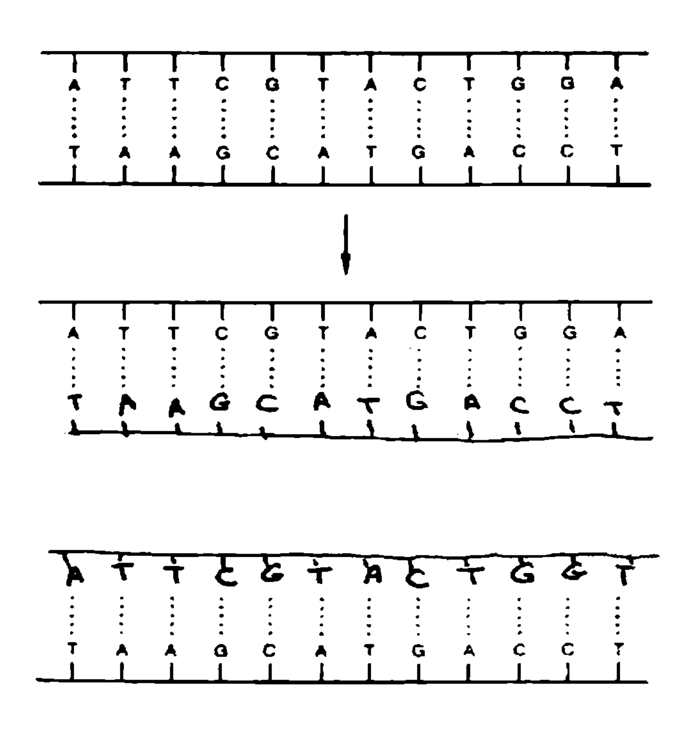
وتعمل الكودونات غير المستخدمة فى تحديد الأحماض الأمينيـــة كإشـــارات توقيف**stop signals** ، فهى تحدد نهاية الجينات، مثل النقطة التى تحـــدد نهايـــة الجملة؛ وعلى ذلك، فإن الجين عبارة عن تسلسل طولى من كودونات تحتـــوى كل منها على ثلاث نكليوتيدات ، يحدد كل منها حمضاً أمينياً معيناً،أو يعمل فى النهاية كإشارة توقيف.

جـــدول ١ – ١ الشفرة الوراثية

The Genetic Code

الوضع الأول	الوضع الثانى				الوضع الثالث
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trap	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Cys	Gly	A
	Val	Ala	Cys	Gly	G
	(Met)				

يتطلب تكوين كودون حمض نووى لتحديد حمض أمينى واحد ، تسلسلاً من ثلاث نكليوتيدات ، ويمكن أن تعطى أربع نكليوتيدات ، ٦٤ مجموعة مختلفة من ثلاثيات النكليوتيد ، وتستخدم جميعها فى الشفرة الوراثية ، وبناء عليه ، فإن كل الأحماض الأمينية فيما عدا حمض ميثيونين (Met) وحمض تربتوفان (Trp) ، يمكن أن تحدد بأكثر من كودون واحد ، بالرغم من أن المجموعة GUG ، التى تحدد عادة حمض الفالين (Val) تحدد فى ظل ظروف معينة حمض الميثيونين بدلاً منه . ولا تسفر كودونات التوقيف ، UAA.UAG و UGA عن أحماض أمينية ، لكنها تعتبر إشارة نهاية البروتين . وظهرت الكودونات كما تظهر فى ر.ن.أ الرسول ، فالقواعد الأربع فى نكليوتيدات الأحماض النووية الريبية هى : ليوراسيل (U) ، والسيتوسين (C) ، والأدينوسين (A) والجوانين (G) ، والأحماض الأمينية التى تحددها الشفرة الوراثية هى : حمض الألانين (Alu) والأرجنتين (Arg) والأسبرجين (Asn) ، وحمض الأسبرتيك (Asp) ، والسيستين (Cys) والجليسين (Gly) والجلوتامين (Gln) والجلوتاميك (Glu) والهيستيدين (His) والأيزليوسين (He) والليوسين (Leu) والليسين (Lys) والمثيونين (Met) والفينالالانين (Phe) والبرولين (Pro) والسيرين (Ser) والثريونين (Thr) والتربتوفان (Trp) والتيروسين (Tyr) والفالين (Val) .



شكل ١-٦ نسخ الــــ د.ن.أ .

عندما يتضاعف الــــ د.ن.أ، فإن جديلتى الجزيء تنفصلان ،وتعمل كل منهما كنموذج لتخليق جديلة متممــــة جديـــدة، حيـــث يضـــمن التزاوج الإجبارى لقواعد الأدنين مع قواعد الثيامين ، وقواعد الجوانين مع قواعد السيتوسين أن يصبح الجزيئان الوليدان نسخة مطابقة من النسخة الأصلية.

كيف يتحول التركيب الجينى إلى تركيب بروتينى؟

How gene structure is translated into protein structure?

تمتلك الخلايا آلية فى غاية الإتقان لتحويل تسلسلات الجينات النكليوتيدية إلى تركيبات بروتينية، وهذه الآلية مطلوبة لأنه لا يوجد للأحماض الأمينية انجــذاباً كيميائياً للنكليوتيدات، الذى يمكن الأحماض الأمينية من التعرف على كودوناتها، وتصطف بالترتيب الذى يحدده الجين، ويجرى التغلــب علـــى هـــذه المشــكلة بمساعدة الأحماض النووية الريبية .

ويتبع تركيب الـــ ر.ن.أ الخطـة العامـة نفـس التـى يتبعهـا تركيـب الـــ د.ن.أ، غير أن هناك اختلافات جوهرية بين نـوعى الحمـض النـووى (ر.ن.أ ود.ن.أ). فجزيئات الـــ ر.ن.أ تعتبر كبيرة أيضاً وتتكون من تـرابط الوحدات البنائية النكليوتيدية معاً، فيما عدا أن جزيئات الـــ ر.ن.أ تحتوى على سكر الريبوز، بدلاً من الريبوز المنقوص الأكسجين، بالإضافة إلـى ذلـك، لا تحتوى الأحماض النووية الريبية على قاعدة الثيامين، لكنها تحتوى على قاعـدة يوراسيل فى المكان الذى يحتوى فيه الـــ د.ن.أ على الثيامين، وأخيراً، فعادة ما تكون جزيئات الـــ ر.ن.أ عبارة عن جديلـة واحدة بـدلاً مـن الجديلـة المزدوجة لجزيء الـــ د.ن.أ، إلا أنه فى بعض جزيئات الـــ ر.ن.أ تنطوى الجديلة الواحدة على نفسها، وبذلك تكون تركيبات لولبية.

وهناك ما لا يقل عن ثلاثـة أنـواع مختلفـة مـن حمـض الريبونكليـك (ر.ن.أ) تساهم فى تخليق البروتين، وعندما يصبح أحد الجينات نشطاً، فإن أول خطوة نحو إنتاج البروتين الذى يشفر عنه، هى نسخ الـــ د.ن.أ إلى جـزيء "ر.ن.أ الرسول"، والذى سمى بهذا الاسم،لأنه يحمل الرسالة المحددة للتركيـب البروتينى إلى جزء الخلية الذى يتم فيه التخليق(شـكل ١-٧). وفـى البكتيريـا وكذلك الخلايا ذات النوى، يتم هذا التخليق فى الجسيمات الصـغيرة المعروفـة بـالجسيمات الريباسية **ribosomes**. وتتكون الجسيمات الريباسية من بروتينات، بالإضافة إلى نوع ثان من حمض الريبونكليك (ر.ن.أ ريبوسومى) الذى يساهم فى تخليق البروتين، وتوجد الجسيمات الريباسـية داخـل سـيتوبلازم الخليـة **cell cytoplasm**، التى إما أن تكون أو مرتبطـة بأغشـية الشـبكة الهيوليـة

الباطنة**endoplasmic reticulum**، وهذا يعنى،أنه فى الخلايا ذات النوى، فإن على الـــ ر.ن.أ الرسول أن يخرج من النواة ويدخل إلى السيتوبلازم.

وعندما يجرى تخليق ر.ن.أ رسول ،فإن الجديلة المزدوجة لـ د.ن.أ الجين يجب أن تنفصل جزئياً ، لكى تكشف جزء من التسلسل النكليوتيدى، والنكليوتيدات الريبوزية التى سترتبط معاً لتشكل الـ ر.ن.أ الرسول تصطف على طول تسلسل الجين، تبعاً لقوانين الازدواج القاعدى المعروفة، فيما عدا أن كل قاعدة أدنين فى د.ن.أ ستزدوج مع قاعدة يوراسيل فى الـــ ر.ن.أ الجارى تخليقه، بدلاً من ارتباطها بقاعدة ثيامين، وعندما تصطف النكليوتيدات الريبوزية بالترتيب الصحيح، فإنها ترتبط ببعضها بواسطة إنزيم يسمى بـــ ر.ن.أ بوليمراز**RNA polymerase**، الذى يتحرك على طول الجين إلى أن يتم نسخه بالكامل فى ر.ن.أ الرسول.

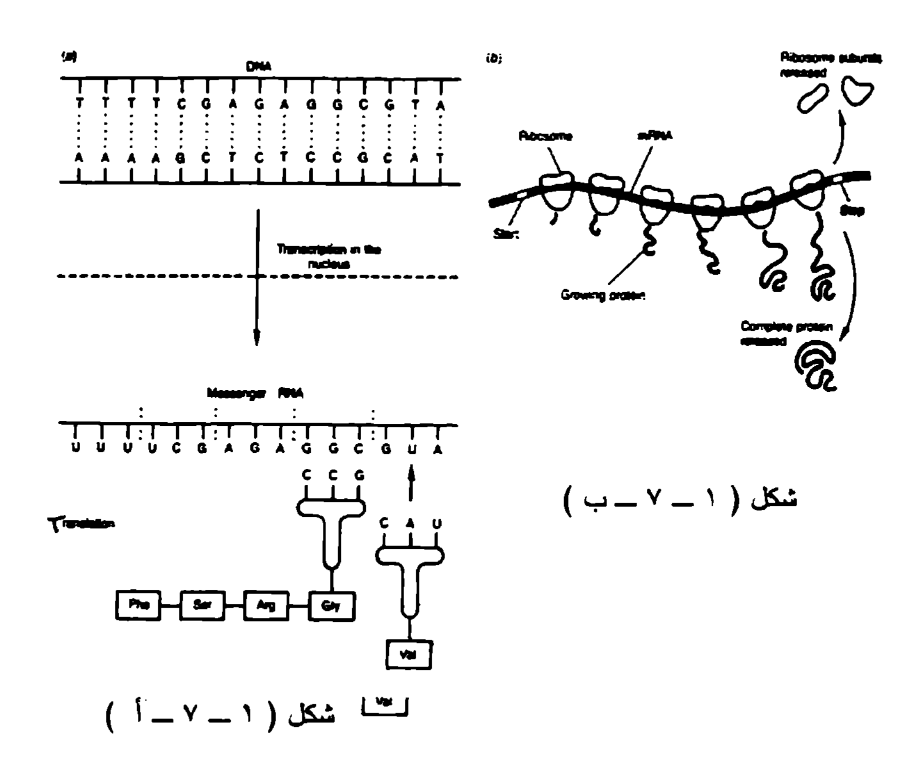
ويعرف تخليق الـــ ر.ن.أ بأنه عملية النسخ الجيني**transcription**، والخطوة التالية،وهى التكوين الحقيقى للبروتين ، تسمى بالتحول **translation** ، وعند هذه المرحلة،يظهر دور الـــ ر.ن.أ الناقل **(transferRNA)**،وهو النوع الثالث من الـ ر.ن.أ، الذى يساهم فى تخليق البروتين، وتستخدم جزيئات الـ ر.ن.أ الناقلة كعوامل معدلة،لصف الأحماض الأمينية لكى ترتبط بالترتيب الذى يحدده الجين ورسوله الـــ ر.ن.أ . ويتعرف الـــ ر.ن.أ الناقل على الكودون المناظر فى ر.ن.أ رسول بواسطة تسلسل متمم ذى ثلاث قواعد (**an"anticodon"**)، الذى يرتبط بالكودون تبعاً لقوانين الازدواج القاعدي**base-pairing rules**.

ولكل حمض أمينى ر.ن.أ ناقل واحد على الأقل، وللبعض منها أكثـــر مـــن ناقل، وتصبح الأحماض الأمينية مرتبطة بجزيئات الـــ ر.ن.أ الناقلة لهـــا،التى تصطف حينئذ على ر.ن.أ الرسول بواسطة الأنتيكودونات المتعرفة، وبالتزاوج القاعدى مع الكودون المناسب، وفـــى النهايـــة، تـــرتبط الأحمـــاض الأمينيـــة إنزيمياً،ويكتمل تخليق البروتين. ومع نهاية فترة الستينات، اكتمل المفهوم العـــام لعمل الجين بدرجة كبيرة ، غير أن جميع الأبحاث الأساسية قد تمت بواســـطة الجينات البكتيرية،وبنهاية فترة السبعينات قام علماء البيولوجيا الجزيئية باكتشاف مدهش لجينات الكائنات العضوية السليمة النواة .

وتمتد التسلسلات المشفرة للبروتين فى الجينات البكتيرية بصورة مستمرة من بداية الجين حتى نهايته، فى حين تتقاطع القطع المشفرة للبروتين فـــى غالبيـــة جينات الخلايا الراقية سليمة النواة عن طريق تسلسلات نكليوتيدية لا تشفر عن تركيب البروتين، هذه المناطق غير المشفرة،والتى تسمى بـــــ بالتسلســـلات العائقة أو "**introns**"يتم نسخها داخل جزيئات ر.ن.أ الناقلة للجينـــات، لكنهـــا تنفصل بعد ذلك، قبل أن يحولها الناقل إلى بروتين.

والفوائد التى تعود على الكائن العضوى سليم النواة بهذا النوع الأكثر تعقيداً من التنظيم الجينى، ليست معروفة بصورة كاملة، وأحد الاحتمالات التـــى تـــم التوصل إليها بالبرهان التجريبى،هو أن الجينات كانت تتجمع خـــلال مرحلـــة التطور عن طريق ضم تسلسلات د.ن.أ مستقلة، تشفر عن قطع بـــروتين ذات قدرات وظيفية مختلفة، وعلى ذلك، فربما تكـــون الانترونـــات"**introns** بقايـــا العملية التى جمعت القطع الوظيفية المختلفة ببعضها. ولم تفسر الأبحاث الأولية عن تركيب الجين وتخليق البروتين الكثير من الكيفية التى يتم بها التحكم فـــى

الجينات، خصوصاً فى خلايا الكائنات الراقية، ولم يبدأ علماء البيولوجيا الجزيئية فى التعامل مع هذه المشكلة، إلا فى السنوات القليلة الماضية، واعتبر هذا أيضاً جزءاً من الثورة التى بدأت فى أوائل السبعينات باكتشاف تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعم **recombinant DNA technology**.



شكل (١ ــ ٧ ــ أ)

شكل (١ ــ ٧ ــ ب)

شكل١-٧ (أ) و(ب) تخليق البروتين . يتطلب تخليق البروتين انفصال جديلتى جزيء الـــ د.ن.أ، لكى تسمحا بنسخ إحدى الجديلتين فى ر.ن.أ الرسول ، و تتم هذه العملية التى تعرف بــ النسخ الجينى داخل النواة التى يوجد بها الجينات ، و بعد ذلك ينتقل ر.ن.أ الرسول من النواة إلى السيتوبلازم، حيث تتم عملية تخليق البروتين .

وفى تلك الأثناء، تربط إنزيمات معينة كل حمض من الأحماض الأمينية بــــ ر.ن.أ الناقل المناسب، ويكون ر.ن.أ الرسول و ر.ن.أ الناقل للحمض الأمينى الأول مركبا مع الجسيم الريباسى، بعد ذلك ، يتحرك الجسيم الريباسى بصورة نشطة على طول جزيء الـــــ ر.ن.أ الرسول ، وأثناء حركته، يتعرف الأنتيكودون الموجود على ر.ن.أ الناقل لكل حمض أمينى متعاقب على الكودون المناظر على الـــ ر.ن.أ الرسول ، ويضع الحمض الأمينى فى مكان لربطه بسلسلة البروتين المتنامية، وبهذه الطريقة، تنتقل المعلومات المشفرة فى التسلسل الطولى للنكليوتيدات فى داخل د.ن.أ الجينات إلى التسلسل الطولى للأحماض الأمينية فى بروتين.

الـــ د.ن.أ المطعـــم

Recombinant DNA

ترجع جذور التطورات التى بلغت ذروتها بتكنولوجيا الـــــ د.ن.أ،إلى أوائل السبعينات، يتكون الــــ د.ن.أ المطعم عن طريق وصـــل أو "تطعــيم" بلغــة البيولوجيا الجزيئية، جزيئات د.ن.أ من مصادر مختلفة، وقد نشأت هذه الإمكانية من خلال الأبحاث التى أجريت على أنزيمات القطـــع **(restriction enzymes)** التى تنتج داخل البكتيريا،كجزء من وسائلها الدفاعية ضد جزيئات د.ن.أ معادية غريبة، مثل جزيئات د.ن.أ الفيروسات، وتقوم إنزيمات القطع بتدمير الـــ د.ن.أ الغريب بتقطيعه إرباً، وفى نفس الوقت ، يحمى د.ن.أ البكتير العائل بواســـطة تعديل كيميائى يمنع الإنزيمات من مهاجمته.

ولإنزيمات القطع اثنين من الخصائص تجعلهـــا عظيمـــة الفائـــدة لعلمـــاء البيولوجيا الجزيئية، أول هذه الخصائص هى تخصصـــها **specificity** ،حيـــث يتعرف كل إنزيم على تسلسل نكليوتيدى واحد فقط داخل الـــــ د.ن.أ ويقطعه، وقد تم تحديد بضع مئات من إنزيمات القطـــع ذات التخصصـــات النكليوتيديـــة المختلفة، ويمكن استخدام الإنزيمات من بين أشياء أخرى، فى وصف خصائص الجينات.

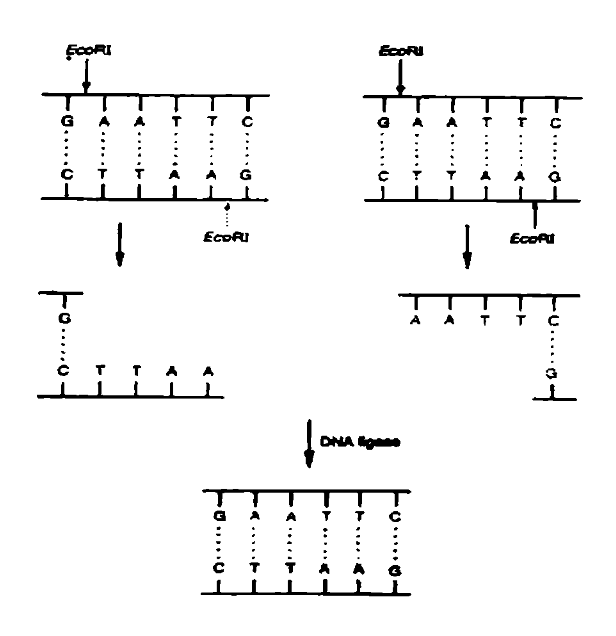
ويمكن مقارنة تركيب اثنين من الجينات عن طريق هضمهما بواسطة سلسلة من عدة إنزيمات قطع، فإذا كانت الجينات متماثلة،فسوف تنتج نفس نمط القطع بالضبط مع كل الإنزيمات، بيد أنه إذا تغيرت تسلسلاتها النكليوتيدية ، فســـوف تنتج أنماطاً مختلفة من أجزاء القطع، ويجرى اســـتخدام خاصـــية التخصـــص

لإنزيمات القطع حالياً، كأساس للأساليب الجديدة في تشخيص الأمراض الوراثية، مثل مرض أنيميا الخلية المنجلية، الذى تسببه تغييرات تركيبية في الجينات (انظر الفصل الرابع عشر).

والخاصية الثانية لإنزيمات القطع ،التى جعلت منها وسيلة مفيدة للغاية ، هى قدرة العديد منها على إحداث قطوعات شطرنجية،عندما تشق جديلة الـ د.ن.أ المزدوجة، والأجزاء(الشظيات) الناتجة بهذه الطريقة تكون جديلة مزدوجة،غير أن لها "أطراف لزجة" ذات جديلة مفردة، ويبرز من طرفى (الشظيات) أذيال ذات جديلة مفردة ، لها تسلسلات قواعد ،التى يمكنها التعرف وتتزاوج قاعدياً مع بعضها البعض(شكل ١-٨). وعلى سبيل المثال، فالشظيات التى ينتجها الإنزيم المسمى بـ**EcoRI** لها تسلسلات وحيدة الجديلة"**AATT**" على أحد الأطراف و"**TTAA**" على الطرف الآخر، (تمثل **A** الأدنين و**T** الثيامين)، وعندما تتجمع الشظيات مع بعضها فى ظروف مناسبة، فإن أطرافها اللزجة ستتحد مرة أخرى، بعد ذلك يمكن أن تتغلق الشظيات مرة أخرى بواسطة إنزيم يسمى(**ligase**)، يعمل على وصل الجدائل ببعضها البعض، وحتى شظيات الـ د.ن.أ من مصدرين مختلفين يمكن وصلهما بهذه الطريقة،على شرط أن يكونا قد نتجا فى الأصل من نفس إنزيم القطع .

كانت مجموعة بول برج **Paul Berg's group** فى مدرسة الطب التابعة لجامعة ستانفورد فى بالو ألتو بكاليفورنيا، أول مجموعة تقوم بوصل جزيئات د.ن.أ غريبة فى جزيء مطعم، حيث قاموا بوصل جينات من بكتيريا أ.كولاى (**E.coli**) مع د.ن.أ من فيروس قرادى ٤٠(**SV٤٠**)، وفى ذلك الحين، لم يكن يدرك الباحثون بعد أن بعض إنزيمات القطع، بما فيها الإنزيم الذين كانوا يستخدمونه، يحدث أطرافاً لزجة، وقام باحثوا ستانفورد بصنع الأطراف

بأنفسهم،من خلال إضافة قواعد مناسبة لشظايا القطع ، ومن الأسهل جعل إنزيمات القطع تقوم بهذا العمل .



شكل ١–٨. توليد "الأطراف اللزجة". تقطع إنزيمات القطع عند تسلسلات نكليوتيدية معينة، وغالبا ما تنتج قطوعات شطرنجية، تنتج "أطرافا لزجة" ذات جديلة واحدة، ومن بين إنزيمات القطع الشائعة الاستخدام ، على سبيل المثال إنزيمEcoRI، الذى يقطع التسلسل الموضح في المواقع المبينة بالأسهم ، ونتيجة لذلك ، فإن الطرف ذا الجديلة الواحدة لإحدى القطع يمكنه التعرف والارتباط بطرف أى قطعة أخرى ينتجها نفس الإنزيم حتى لو كانت القطع فى الأصل قد جاءت من أنواع د.ن.أ مختلفة، ويمكن للقطعتين أن يوصلا ببعضهما من خلال تأثير إنزيم يسمى د.ن.أ ليجاز، وهذا الإجراء يشكل الأساس لتكنولوجيا د.ن.أ المطعم.

ومهدت إمكانية صنع جزيئات د.ن.أ مطعمة الطريق لعزل وإنتاج كميات غير محدودة من أى جين مطلوب ، ويمكن إدخال جزيئات د.ن.أ غريبة فى د.ن.أ فيروسية،كما أوضح بيرج وزملاؤه ، والتى يمكن استخدامها كوسائل لإنتاج الجينات الغريبة فى البكتيريا أو الخلايا المستزرعة الأخرى، وسوف تنتج بعد ذلك جزيئات الـ د.ن.أ المطعمة فى الخلايا، وبذلك تولد كميات كبيرة من الجينات الغريبة.

ويمكن استخدام البلازميدات plasmids أيضاً في إنتاج جينات غريبة (شكل ١-٩). فالبلازميدات هى عبارة عن جزيئات د.ن.أ حلقية، ذات جديلة مزدوجة، وتوجد بصورة طبيعية فى البكتيريا، حيث تتكاثر بصورة مستقلة عن الكرموسوم البكتيرى.

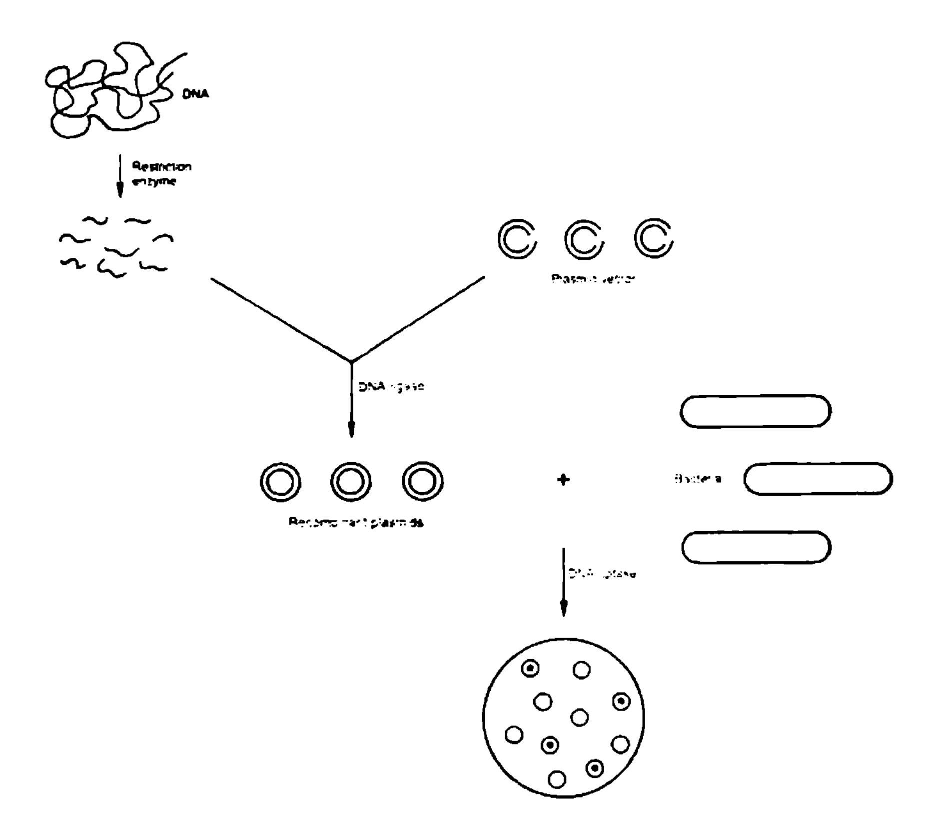
وكان البلازميد المسمى بـ pSC١٠١، أول بلازميد يطور كأداة لإدخال د.ن.أ غريب فى البكتيريا، حيث تم اكتشافه فى معمل ستانلى كوهين Stanley Cohen's laboratory فى مدرسة الطب بجامعة ستانفورد، وقد استطاع كوهين وآنى تشنج Annie Chung من ستانفورد أيضاً ومعهم هربرت بوير Herbert Boyer وروبرت هلينج Robert Helling من جامعة كاليفورنيا فى سان فرانسيسكو، أن يدخلوا جيناً غريباً فى البلازميد، وأثبتوا أنه لا يزال يتكاثر بطريقة طبيعية داخل البكتيريا.

ويسمى إكثار الجينات الغريبة فى الخلايا البكتيريا أو الخلايا الأخرى باستنساخ الجين gene cloning، وتشير كلمة استنساخ Clone إلى مجموعة كيانات سواء كانت نباتية، أو خلايا بكتيرية، أو جينات كما فى حالتنا هذه، وتعتبر جميعها نسخ طبق الأصل من فرد واحد. وكنتيجة لتطوير الـ د.ن.أ المطعم وتكنولوجيا استنساخ الجين،أصبح من الممكن إنتاج كميات كبيرة من جينات معينة، وتكمن صعوبة المشكلة فى تحديد الخلايا التى تصنع الجين الغريب المطلوب،غير أن علماء البيولوجيا الجزيئية استطاعوا استنباط عدة أساليب للقيام بذلك، والتى سوف تناقش بشكل مفصل فى (الفصل الرابع).

وباشتراك تكنولوجيا استنساخ الجين مع التطورات الحديثة فى طرق تحليل الـ د.ن.أ التى أمكن التوصل إليها،أصبح أكثر سهولة تحديد التسلسلات النكليوتيدية للجينات عن تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات، وينطبق هذا بصفة خاصة على البروتينات الموجودة فى خلايا بتركيزات منخفضة، ويصبح من الصعب فصلها عن البروتينات الملوثة، وفى أغلب المرات ، كان ناسخو الجين،هم الذين قدموا أول تسلسلات حمض أمينى كاملة للبروتينات المهمة، وبمجرد أن يصبح الجين المستنسخ متوفراً ، فالتسلسل النكليوتيدى،ومن ثم تسلسل الحمض الأمينى المناظر له يمكن الحصول عليه فى غضون أسابيع.

وتمثل هذه السهولة النسبية فى الحصول على التسلسلات الجينية، تغيراً ملحوظاً فى الموقف الذى كان سائداً عام ١٩٧٠، فتسلسل الجينات، ولاسيما للكائنات الراقية، كان يعتقد إلى حد بعيد فى ذلك الحين أنه لا يمكن الحصول عليه، فقد كان من الصعب تحديد التسلسلات البروتينية، إلا إذا توفر الوقت الكافى، ووجدت عينة البروتين النقية التى سيجرى عليها البحث، وكانت المشكلة القائمة، هى الحاجة إلى كمية كبيرة نسبياً من البروتين للحصول على تسلسل حمض أمينى كامل، وكان يجرى تخليق البروتينات المهمة بكميات ضئيلة، بيد أنه حتى إلى وقتنا هذا، فلا يزال يلعب الترتيب المتوالى المباشر للبروتين دوراً مهماً فى البيولوجيا الجزيئية، ومع مقدم طرق أتوماتية جديدة لتحليل تسلسل البروتين، مثل تلك الطريقة التى طورها ميشيل هانكابلر **Michael Hunkapillar** وليروى هود **Leroy Hood** فى معهد كاليفورنيا للتكنولوجيا فى باسادينا،جعلت من الممكن على الأقل تحديد تسلسلات أحماض أمينية جزئياً من عينات صغيرة

جداً من البروتينات، فلا يتطلب من المادة أكثــر مــن بضــع ميكروجرامــات (الميكروجرام، واحد من المليون من الجرام.)



شكل ١-٩ استنساخ الجين. يقطع د.ن.أ من مصدر مرغوب بواسطة إنزيم قطع، مثل إنزيم EcoRI ، ويتم إدخال القطع بطــرق الـــ د.ن.أ المطعم في بلازميد أو متجه استنساخي أخر،والتي ستتكاثر في خلايا عائلة مناسبة، وفــي الماضــي ، كانــت الخلايــا البكتيرية تستخدم في الأساس ، بينما تستخدم حالياً خلايا الكائنات الراقية على نطاق واسع، وبعد إدخال البلازميدات المطعمة فــي عوائل مناسبة، تنمو الخلايا في المزرعة،بحيث تصبح كل مستعمرة متكونة مستنسخا يتكون من ذرية خلية واحدة.

وعادة ما يحتوى متجه الاستنساخ على جين يشفر عن إحدى الصفات المرغوبة،مثل مقاومة المضادات الحيوية، وإذا ما حدث هذا،فلا تنمو إلا الخلايا التي تكتسب البلازميد المطعم في وجود المضاد الحيوي، و أكبر مشكلة تواجه استنساخ الجين،هي تحديد المستنسخات التي تحمل الجين الذي يسعى الباحث إلى عزله، ويمكن القيام بذلك بعدة طرق مختلفة، ويمكن الكشــف عــن المنــتج البروتينــي بواسطة نشاطه،إذا كان له نشاطاً محسوساً ، أو يمكن الكشف عنه بواسطة جسم مضاد أحادى الاستنساخ معين، وبمجرد أن يتم عزل الجين،فيمكن أن يصنع منه أو من منتجه كميات كبيرة في الخلايا العائلة.

وغالباً ما يكون تسلسل حمض أميني جزيئيا، الأساس لاستنساخ الجينـــات أو لبروتينات النادرة، ويمكن إنشاء المجسات التي تتكون من تسلسلات نكليوتيدية مناظرة لتسلسل الحمض الأميني،واستخدامها في الكشف عن الجين المستنســـخ لمرغوب، بالإضافة إلى ذلك، فإن البيبتيدات نفسها يمكن أن تخلق وتستخدم في صنع أجسام مضادة **antibodies**، التي ستتفاعل مع البروتين السليم(انظر الفصل لثالث عشر). ولهذه الأجسام المضادة تطبيقات عديدة، تشـــمل الكشـــف علــــى تخلايا المهندسة وراثيا،التي تحتوي على الجين المستنسخ للبروتين الذي يتعرف عليه الجسم المضاد.

التحكـــــم في تعبيـــــر الجيـــــن

The control of gene expression

وساعدت تكنولوجيا الــــ د.ن.أ المطعم بدرجة كبيرة أيضاً على حل مشكلة كبرى تتعلق بتخليق البروتين، والتي لم يكن من المستطاع تحديده بسهولة فـــي الوقت الذي وضع فيه المخطط العام لبحث كيفية عمل الجينات، وتتعلــق هـــذه المشكلة بالسؤال عن الشيء الذي يجعل جين معين نشطاً أو خامداً عندما يقـــوم بتوجيه تخليق بروتين يشفر عنه.

وكان الافتراض، هو أنه بعض المعلومات على الأقل المطلوبة لتنظيم تعبير الجين، ستشفر داخل الــــ د.ن.أ نفسه وقد لاقى هذا الافتراض قبولاً إلى حـــد كبير، ويقوم علماء البيولوجيا الجزيئية بتحديد تسلسلات معينة من د.ن.أ،تســـهم في التحكم في الجين، وقد قام الباحثون بذلك،عن طريق إزالة قطع د.ن.أ بطريقة منتظمة من داخل وحول الجينات الجاري دراستها،ثم إدخال الجينات المتغيـــرة

فى الخلايا، للنظر فى كيفية تأثير التغييرات على نشاط الجين، وتشمل التسلسلات المنظمة regulatory sequences التى تم تحديدها تشمل كلاً من التسلسلات التى تزيد من التعبير الجينى، التى تشمل المحرضات promoters والمعجلات enhancers والتسلسلات التى تقلل من نشاط الجين.

وتعتبر هذه المعرفة أساسية للعديد من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية لتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، والتعبير السليم عن جين منقول فى خلايا أو أنسجة مناسبة يعتبر شرطاً لازماً فى العديد من التطبيقات، وينطبق هذا على الجهود المقترحة لعلاج الأمراض الوراثية البشرية بواسطة العلاج بالجين gene therapy، لكنها تنطبق أيضاً على الجهود المستهدفة لتحسين المحاصيل الزراعية،عن طريق إدخال جينات جديدة، ولإنتاج الهرمونات أو البروتينات الأخرى المهمة تجارياً فى الخلايا الغريبة.

وعلى الرغم من أن بعض التسلسلات المنظمة قد تعمل على نطاق كبير من الأنواع أو الخلايا الأخرى،إلا أنها لا تنجح إلا مع بعض أنواع الخلايا، وعلى سبيل المثال،فإن معجلات جينات الأجسام المضادة للثدييات، تكون نشطة فى الخلايا المنتجة للجسم المضاد،لكنها لا تنشط فى أنواع الخلايا الأخرى، وبانضمام جين سيتم التعبير عنه فى خلية غريبة إلى تسلسلات منظمة تعمل بكفاءة فى هذا النوع من الخلايا،يمكن أن يكون نجاحها عظيم الشأن فيما بعد فى أى تطبيق تكنولوجى حيوى.

القيــود المفروضــة على تكنولوجيــا الــــ د.ن.أ المطعــم

Restrictions on recombinant DNA technology

على الرغم من صعوبة حصر الإسهامات التى قدمتها تكنولوجيا الــــ د.ن.أ المطعم واستنساخ الجين إلى البيولوجيا الجزيئية الأساسية والمجال المتنامى من التكنولوجيا ، إلا أن الأبحاث لم تخل من انتقادات وخلافات جدلية، فالقدرة على جمع جزيئات د.ن.أ من كائنات عضوية مختلفة، وإدخال هذه الجزيئات المطعمة فى أنواع عديدة، أثار الاهتمام بأن هذه التجارب قد تخلق بدون قصد من العلماء جراثيم جديدة خطيرة، ويمكن أن تهرب من بيئة المعمل، وبلغ الاهتمــام أشــده بسبب بكتيريا أ.كولاى، التى كانــت و لا تــزال تســتخدم فــى العديــد مــن التجارب،والتى تسكن بصورة طبيعية فى أمعاء الإنسان.

وكان العلماء الذين يقومون بإجراء التجارب،هم أول من أدرك هذه المخاطر المحتملة ،واتخذوا خطوات غير مسبوقة ، حيث عقدوا اجتماعاً فى عام ١٩٧٤، تحت مظلة الأكاديمية القومية للعلوم **National Academy of Science** بالولايات المتحدة الأمريكية،وأوصوا بأن أنواع معينة من تجارب الــــ د.ن.أ المطعــم البالغة الخطورة،يجب عدم إجرائها إلى أن يتم عقد مؤتمر دولى لرسم سياسات عامة،تسمح للبحث بأن يجرى فى أمان، وتضمنت التجارب المحظور إجراؤها تلك التجارب التى يجرى فيها إدخال جينات إنتاج السموم أو المقاومة للمضــاد الحيوى فى الكائنات العضوية التى لا تحتوى عليها بالفعل.

وقد تأخر القرار الرسمى المقصود حتى فبراير عام ١٩٧٥، إلــى أن عقــد المؤتمر الدولى فى مركز مؤتمرات أسيلومار فى باســيفيك جــروف بولايــة

كاليفورنيا، وأوصى المشاركون فى المؤتمر بعدم إجراء أبحـــاث الــــــ د.ن.أ المطعم إلا تحت درجات متزايدة من الموانع البيولوجية أو الطبيعية تبعاً لدرجة الخطـــورة المتوقعـــة مـــن التجربـــة، ويقصـــد بالمـــانع الطبيعـــي **physical containment**،استخدام الوسائل المعملية التى تقلل أو عند مستويات أعلى تمنع هـــروب الكائنـــات الدقيقـــة، ويقصـــد بالمـــانع البيولـــوجي **biological containment**،استخدام الكائنات العضوية أو المتجهات التى تغيرت،بحيـــث لا يمكنها البقاء إلا فى ظروف معملية خاصة.

وكان على كل دولة ممثلة فـــى المـــؤتمر أن ترســـم توجيهاتهـــا الخاصـــة بها،لتصنيف مخاطر تجارب الـــ د.ن.أ المطعم،وتحديد الظروف التى يمكن فى ظلها إجراء التجارب، وفى الولايات المتحدة،أوكلت هذه المهمة إلى لجنة شكلتها المعاهد القومية للصحة(**NIH**) فى بثيدسا بولاية ميريلاند، والتى ساندت فى ذلك الحين معظم الأبحاث الجارية، ولم تصبح توجيهات المعاهد القوميـــة للصـــحة متاحة للاستخدام إلا فى يونيو عام١٩٧٦، وفى السنوات المنحصرة، كان العمل بالتوجيهات مهملاً بدرجة كبيرة،حيث فشلت الخبرة المتزايدة فـــى إثبـــات أيـــة مخاطر من أبحاث الـــ د.ن.أ المطعم فى المعمل.

وأصبحت سياسات المعاهد القومية للصحة لا تطبق فى المقام الأول إلا على الأبحاث التى وافقت عليها المعاهد، وكان يعنى تطـــور صـــناعة التكنولوجيـــا الحيوية،عدم خضوع قدر كبير من أبحـــاث تكنولوجيـــا الـــــ د.ن.أ المطعـــم للتوجيهات، على الرغم من أن الشركات التى كانت تقوم بالأبحاث،كانت تتبعها بصفة عامة بأية حال، ويتركز الاهتمام الحالى إلى حد بعيـــد علـــى الإطـــلاق المتأنى الآمن للكائنات العضوية المتغيرة جينياً فى البيئـــة،التى تشـــمل علـــى

نبتت والكائنات العضوية الدقيقة،التى بدأت تنتجها الصناعة للاستخدامات الزراعية، وقد أدى اقتراح معالجة الأمراض الوراثية البشرية بإدخال نسخ سليمة بدلاً من الجينات المصابة إلى إثارة الاهتمام أيضاً، وقد أخذت موضوعات الأثر الأخلاقية والتنظيمية للتكنولوجيا الجديدة فى الاعتبار،وسوف تناقش فى الفصل الثامن والسادس عشر من هذا الكتاب.

الفصل الثانى :

تخليــق بــدون خلايــا

Synthesis without cells

كانت ستجرى معظم التفاعلات الكيميائية التى تحدث داخل الكائنات الحيــة بصورة بطيئة جداً لدعم الحياة، لولا وجــود الحــوافز البيولوجيــة المعروفــة بالإنزيمات Enzymes، وغالباً ما تعجل هذه الجزيئات من سرعة التفاعلات بعدة درجات متفاوتة، ومن ثم تتيح للخلايا بأن تحصل على الطاقة التــى تحتاجهــا، وتقوم بتخليق الجزيئات التى تتكون منها،وتهدم وتزيل بقايا منتجاتهــا، وعلــى سبيل المثال، فالخطوة الأولى فى انهضام الســكرglycolysis، وهــو المســار الأيضى الذى يحول سكر الجلوكوز إلى طاقة كيميائية، يقوم بتحفيزهــا إنــزيم هيكسوكينازHexokinase، ويعمل الهيكسوكيناز على تعجيل سرعة التفاعــل،إذ يحول الجلوكوز إلى جلوكوز-٦-فوسفات، بمقــدار $١٠^{٩}$ مــرة (أى أن ســرعة التفاعل تتم بمعدل مليار مرة مما لو تم التفاعل بدون وجود الحافز الإنزيمى).

لا يقتصر نشاط الإنزيمات على مساهماتها الأساسية فى الأنشطة الخلويــة، لكن يوجد لها أيضاً مجال تطبيق واسع فى التكنولوجيا الحيوية؛ فهى تستخدم من بين أشياء أخرى فى صناعة الأغذية لصنع الجبن والبيرة والنبيذ والمّحليّات،من بين أشياء أخرى، وفى الصناعات الكيميائية والدوائية فى تخليــق الأحمــاض الأمينية والمضادات الحيوية، بالإضافة إلى ذلك، فإن لها دورا آخذًا فى النمو فى مجال الطب، وأحد التطبيقات الدوائية ذو الأهمية المتزايدة استخدام إنزيم يسمى

بـــــمنشط نسيج مولـــد البلازمـــين tissue plasmogen activator فـــى إذابـــة الجلطات الدموية لمرضى القلب.

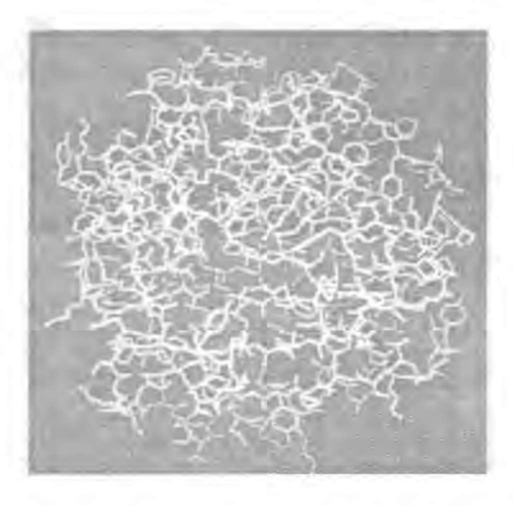
وتعتمد تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للإنزيمات على خصائصـــها الفريـــدة، فالإنزيمات عبارة عن بروتينات ذات أوزان جزيئية تتراوح ما بـــين ١٠٠٠٠ و ٥٠٠٠٠ ، وعلى سبيل المقارنة، فالماء له وزن جزيئى ١٨، ولملـــح الطعـــام وزن جزيئى ٥٩، ويسمح الوزن الكبير للإنزيمات بأن تتخذ أشكالاً ثلاثية الأبعاد محددة تماما، وتحافظ على توازنها من خلال التفاعلات الداخلية بين الأحمـــاض الأمينية المكونة لها.

وتعد هذه الأشكال فى غاية الأهمية لأحد أكثر صفاتها أهمية وهى القـــدرة على التعرف والتأثير بطريقة خاصة على أحد أو بعض المواد، التـــى تســـمى بالركائز substrates ،حتى لو كانت المواد موجودة فى خليط معقـــد، ولإنـــزيم هيكسوكيناز مراكز تعرف للجلوكوز وثلاثى فوسفات الأدينوزين (ATP)، التى ترتبط بأحدها الآخر بالإنزيم بعلاقة وثيقة (شكل٢-١)، وبعد الارتباط ، تنتقـــل مجموعة الفوسفات من ثلاثى الفوسفات الأدينوزين إلى الجلوكوز، ومن ثم تنتج ثنائى الفوسفات الأدينوزين (ADP) وجلوكوز-٦-فوسفات، ويطلق الإنزيم بعد ذلك المُنتجَين،ويمكنه أن يحفز دورة تفاعل أخرى بين الجلوكوز وثلاثى فوسفات الأدينوزين.

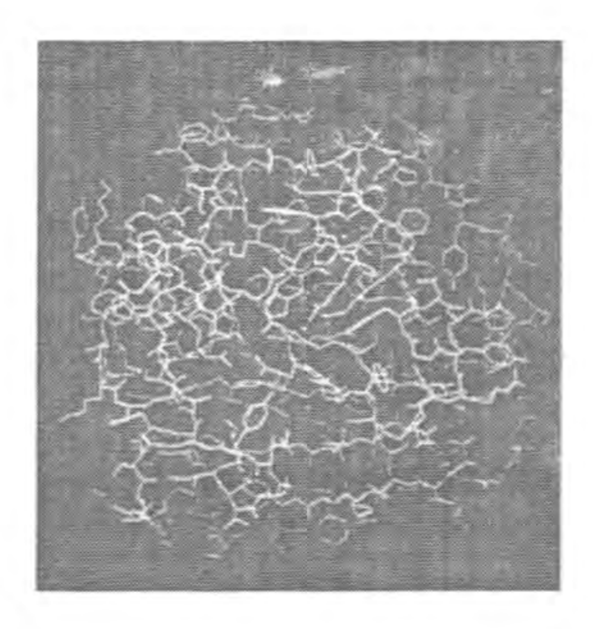
Glc + ATP —Hexokinase→ Glc-6-P + ADP

Glc + ATP + HK ⇌ HK·Glc·ATP ⇌ HK·Glc-6-P·ADP ⇌ Glc-6-P + ADP + HK

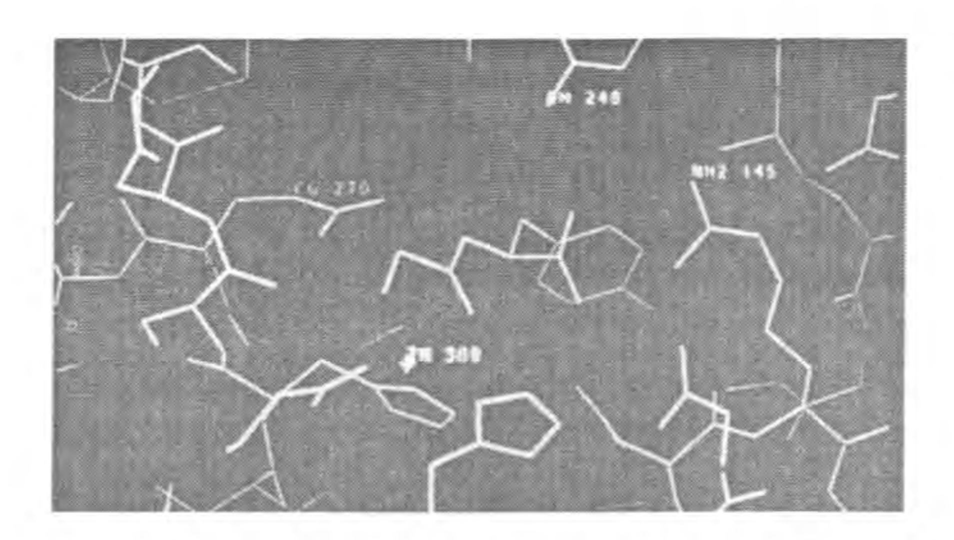
شكل ٢-١. يعجل انزيم هيكسوكيناز (HK) تفاعل الجلوكوز(GLc) و ثلاثى فوسفات الأدينوزين (ATP)لتكوين جلوكــوز-٦-فوسفات(GLc-٦-P) و ثنائى فوسفات الأدينوزين(ADP)، و إنزيم الهيكسوكيناز ذاته لا يستهلك أثناء التفاعل.



شكل ٢-٢. نموذج مستخرج من الكمبيوتر لمركز نشاط إنزيم كاربوكسى بيبتيداز أ(carboxypeptidase A)، و يشكل مركز النشاط الذى يعتبر منطقة ارتباط البروتين بالركيزة ، والذى يتم به النشاط الحفزى، شقا صغيرا فى سطح البروتين الإنزيمى.



شكل٢-٣. ارتباط الركيزة بمركز نشاط إنزيم كاربوكسى ببتيداز أ. والركيزة هنا مشتقة من حمض بنزيل بروبيونيك ، تتوافــق بالقرب من الشق على سطح الإنزيم.



شكل٢-٤. صورة مكبرة لمركز نشاط إنزيم كاربوكسى ببتيداز أ. و الركيزة هنا ، هى جليسيلتروسين ثنائى الببتيــد، والأحمــاض الأمينية للإنزيم التى تعتبر فى الارتباط تظهر باللون الأحمر، وكما هو موضح من خلال الأرقام المبينة لمواضعها فى سلسلة البروتين، فقد تكون واقعة بعيداً فى التسلسل الطولى للبروتين،لكنها تتقارب من بعضها،عندما ينطوى البر وتين فى تركيبه الثلاثى الأبعاد .

وتتوافق الركيزة مع موقع تعرف محدد على الإنزيم بصورة تشــبه تمامًــا توافق المفتاح مع القفل (شكل ٢-٢،٢-٣) ، غير أن الإنزيمات أكثر مرونة من القفل ، حيث يتغير شكل الإنزيم بعض الشيء تبعًا لارتبـــاطه بـــالركيزة ، ولا يوجد سوى بعض الأحماض الأمينية للإنزيم تكون متصلة بالفعل بـــالركيزة المرتبطة (شكل ٢-٤) ، وقد تتباعد هذه الأحماض الأمينية عن بعضها تمامًــا على طول التسلسل الطولى للبروتين الإنزيمى ، وإذا تمزق التركيـــب الثلاثـــى البعد الذى يضعها فى الوضع السليم للارتباط بالركيزة ، فربما يفقد الإنـــزيم نشاطه .

والتخصص الشديد High specificity للإنزيمات فى تعرفها على الركيزة وتفاعلها الحفزى ، يعد الأساس فى العديد من تطبيقاتها ، وأحد أنواع الانتقـــاء المهمة التى تبديها العديد من الإنزيمات ، هـــى قـــدرتها علـــى التمييـــز بـــين الجزيـــئات الإنانتيـــوميرية ، أو جزيئات الصورة المرآوية (شكل ٢-٥) . والإنانتيومرات (enantioners) هى أيسومرات مجسمة لهـــا نفـــس التركيـــب الكيميائى ، فى حين أن ذراتها مرتبة فى الفراغ بطريقة مختلفـــة ، ويمكـــن أن تكون الإنانتيومرات من أى جزىء له ذرة كربـــون غيـــر متماثلـــة ، أى ذرة كربون مرتبط بها أربع مجموعات مختلفة ، ولا يمكن تمييز معظم الخصـــائص الطبيعية للإنانتيومرات ، ولذا يصعب فصلها .

ومع ذلك فعادة ما يمكن أن تتمايز الإنزيمات فيما بينها، وعنـــد تعـــريض مزيج من الأنانتيومرات N-acetyl-L-alanine و N-acetyl - D-alanine لإنزيم acylase I لا ينشـــأ عنه إلا إزالة مجمـــــوعـــــة acetyl من L- enantioner ، ويطـــــلق التفاعل L-alanine الـــذى يعـــتبر إنـــانتيومر موجود بصورة طبيـــــعية لهذا الحمـــــض الأمينـــى . ويمكـــن فصـــل الحمـــــض الأمينى الحر بســــــهولة من N-acetly-D-alanine الثابت ،

وعلى ذلك توفر عملية التميؤ الإنزيمى للأنانتيومر الانتقائى أسلوبًا سـهلاً ويمكن استخدامها على نطاق واسع لفصل الإنانتيومرات .

ولأساليب الفصل هذه أهمية عظيمة جدًا ، فغالبًا ما تتصرف الانانتيومرات بطريقة مختلفة تمامًا فى النظم البيولوچية ، فقد يكـون إحـداها دواء مفيـدًا، فىحين يكون الـبعض الآخـر شـديد السـمية ، ويعطـى عقـار ثالدوميـد thalidomide مثالاً لذلك ، فالإنانتيومر النقى R(+) يعتبر مهدئًا أمنًا نسـبيًا ، وقد نتجت عيوب الولادة الخطيرة التى حدثت عندما أعطى الثالدوميـد للمـرأة الحامل بدلاً من إعطائها كميات صغيرة جدًا مـن إنـانتيومر S (−) كانـت موجودة فى صورة (شوائب ، ومع ازياد الاهتمام بتخليق الدواء وزيادة ضـغط الوكالات المنظمة للصحة ، تقدم حاليًا حوافز مهمة لابتكار طرق لصنع عوامل دوائية خالية من التلوث بالإنانتيومرات غير المرغوبة.

وللحـافزات الإنزيمية عدة خـواص أخرى مهمة بالإضافة إلى خاصية تخصصها للركـيزة ، فهى تخضع لنظـام ؛ أى أن هناك جزيئـات أخـرى يمكن أن تعدل أنشـطتها − وهى خاصيـة على درجة من الأمية للتحكم فـى المسارات الكيـميائية الحيوية فى الخـلية ، وعـلاوة على ذلـك ، تعمـل الإنزيمات فى ظـل ظروف معـتدلة ، حيث يعمـل معظمها بصورة جيـدة فى المـاء عنـد أس هيدروجينى متعادل ، وفى درجـة حـرارة الغرفـة ، وهـذه الظروف مـواتية تمـامًا للتطبيقات الصـناعية ، فيما يتعلق بتوفير الطـاقة والحـفاظ على البيئـة ، وغـالبًا ما يتطلب القيام بـإجراء تفاعلات كيميائية مشـابهة بدون اسـتخدام الإنزيمات ظروفـا صـعبة ، تتضمن درجـات حرارة عالية ، وأسـس هيـدروجينية قلوية أو حمـضية جدا ، وربمـا الأكثر أهمـية من وجهـة نظـر صـناعية ، أنـه يمكن للإنزيمـات القـيام بالتـفاعـلات التى لا يمـكن إجرائهـا بأى

عريقة أخرى، وقد تستخدم على وجه الخصوص فى تخليق الجزيئات البيولوجية لمعقدة التى لا يمكن تخليقها بأية وسيلة أخرى.

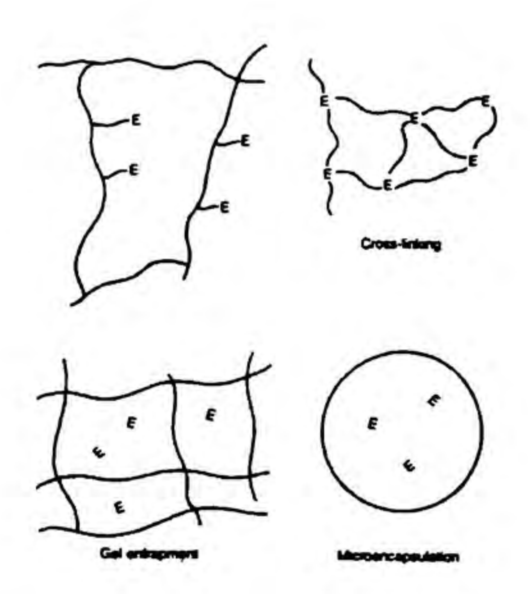
ولعيب الرئيس للحافزات الإنزيمية ، هو أنها هشة نسبيا بالمقارنة بالحافزات نغير العضوية مثل البلاتنيوم أو حمض الكبريتيك، وغالباً ما يخمد نشاط الإنزيمات بفعل درجة الحرارة التى تزيد عن درجة حرارة الغرفة،التى تمزق تركيباتها الثلاثية الأبعاد ، وقد تفقد نشاطها أيضا إذا ما تعرضت للهواء أو لمذيبات العضوية أو إلى ظروف حمضية أو قلوية. وهشاشة الإنزيمات يعد عيب على وجه الخصوص لأنها لا تزال الأكثر تكلفة نسبياً بالنسبة لمعظم لحافزات غير الإنزيمية، على الرغم من أن طرق إنتاج الإنزيمات آخذة فى لتحسن.

شكل ٢-٥. للحمض الأمينى الانين مركزاً غير متماثل ، فهو يوجد فى صورتين متماثلتين غير أنهما أيسومرات صور مر أوية من حداهما الأخرى ، وتسمى تركيبات بمثل هذه الصور المر أوية بالإنانتيومرات ، ويعد الانين L-enantiomer أحد الإنتيومرات الموجودة فى البر وتينات وتوجد معظم مشتقات الألانين الأخرى بصورة طبيعية، ونادراً ما يوجد D-alanine فى الطبيعة.

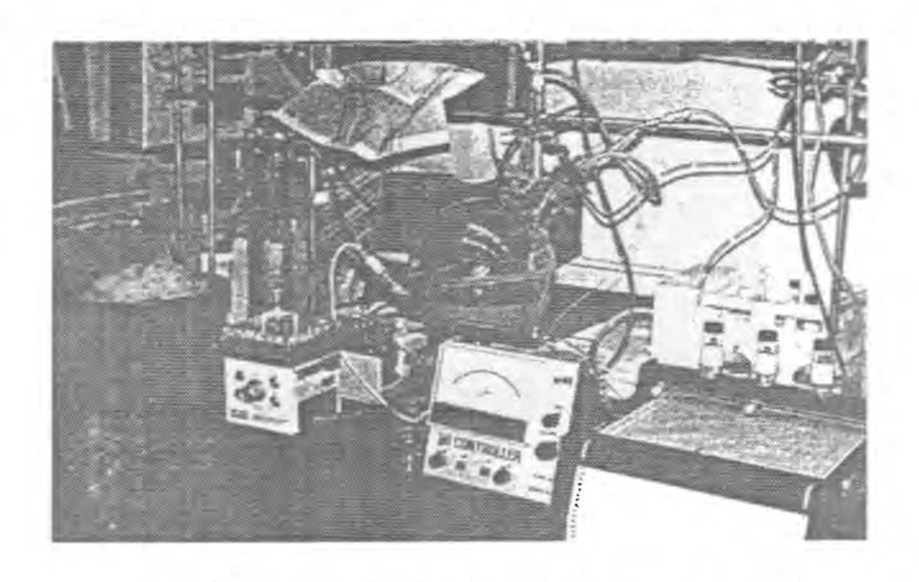
وعلى الرغم من ذلك يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق تطوير طرق لتثبيت الإنزيم . وتوفير بيئة تطيل من عمر الإنزيم تعد مسألة تجربة وخطأ ، فى حين أن تثبيت الإنزيم أحد الأساليب التى تنجح غالباً ، وفى نفس الوقت تقلل من تكلفة استخدام الإنزيمات .

ويمكن شل حركة الإنزيم بتركيزه أو تطويقه بدعامة صلبة ، وهو إجراء يعطى بعض المميزات العملية التى تفوق استخدام الإنزيم فى صورة سائلة ، ويرسخ تثبيت الإنزيمات إلى حد ما ، بجعلها أكثر مقاومة لقوى القص ، ولهجوم البروتيازات proteases عليها ، التى تعتبر فئة من الإنزيمات ، تعمل على تحطيم البروتينات الأخرى ، بالإضافة إلى ذلك ، يمكن فصل الإنزيم المشلول الحركة بسهولة عن الخليط فى نهاية التفاعل ، وبذلك يمكن استخدامه مرة أخرى ، وتؤدى هذه الاستعادة إلى سهولة عزل المنتج وتقليل تكلفة التفاعل .

ويمكن شل حركة الإنزيمات ، إما كوحدات نقية أو كعناصر من مجموعة من الخلايا ، تكون عادة ميتة ، وتتضمن طرق شل الحركة ، ربط الإنزيم بصورة تساهمية بدعامة صلبة ، أو احتجازه فى طبقة جل ، أو تشبيك جزيئات الإنزيم ببعضها ، أو تغليفها فى خلايا اصطناعية صغيرة (شكل ٢-٦) .

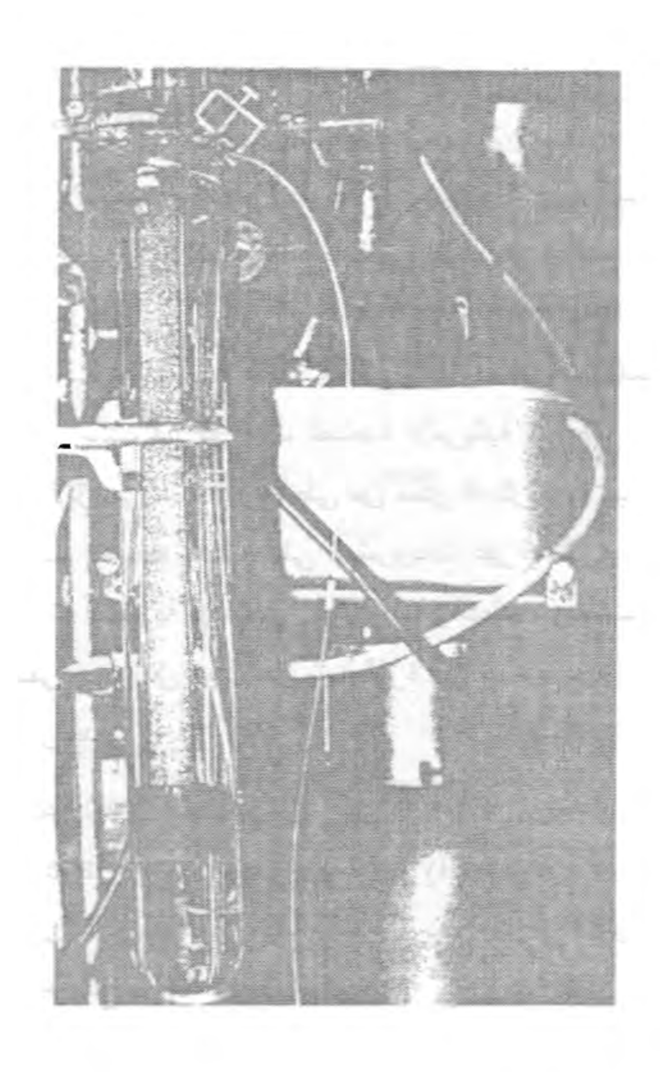


شكل ٢-٦ طرق شائعة لتثبيت الإنزيمات، تتضمن(E) ربطها بالأسطح (ربط تساهمى) ، واحتجازها فى طبقة من الجيــل، وتشـــبيك جزيئات الإنزيم ببعضها،وعزل الإنزيمات فى خلايا اصطناعية.



شكل ٢-٧ مفاعل معملى يحتوى على إنزيم مشلول الحركة.

وبمجرد أن يشل حركة إنزيم ، فيمكن أن يستخدم فى أى نوع من المفاعلات reactors العديدة ، التى لكل منها مميزاته وعيوبه ، فمفاعل العبوة batch reactor ، وهو خزان يحتوى على الإنزيم والركيزة (شكل ٢-٧) ، من المفاعلات التى يسهل إقامتها ، غير أن الخليط الذى يتطلب تقليبا مستمرا ، يؤدى أحياناً إلى هدم الإنزيم ، ومن المفاعلات شائعة الاستخدام فى التطبيقات الصناعية ، مثل إنتاج شراب الذرة عالى الفركتوز high - fructose corn syrup ، مفاعل القاعدة الثابتة fixed bed reactor ، ويتكون هذا المفاعل من عمود يتم حشوه بإنزيم مثبت ، وتنساب الركيزة خلاله (شكل ٢-٨) . وتعد الطريقة من الطرق الفعالة ، ويمكن تحويلها إلى صورة أوتوماتيكية بالرغم من أنه قد يحدث انسداد للعمود فى بعض أنواع شل الحركة ، والمفاعل ذو القاعدة المسيلة fluidized bed-reactor ، الذى يجعل الركيزة تصعد لأعلى ، بأن يسلك الإنزيم سلوك السائل يحل هذه المشكلة ؛ ومع هذا فإن هذا الإجراء يعتبر أكثر تعقيدًا وكلفة عن الطرق الأخرى .



شكل ٢-٨ مفاعل عمودى يحتوى على إنزيم مشلول الحركة .

استخدامات الإنزيمات الحالية

Current uses of enzymes

الأغذية والمشروبات

Food and beverages

استخدمت الإنزيمات منذ فترة طويلة فى تصنيع الجبن والبيرة والنبيذ ، وبدأ استخدام الإنزيمات فى التطبيقات الصناعى يتزايد فى الآونة الأخيرة بشكل ملحوظ ، ويعتبر شراب الذرة عالى الفركتوز high - fructose corn syrup، من المنتجات التى يجرى إنتاجها بكميات كبيرة ، ويتم تصنيعها بواسطة تكنولوجيا الإنزيم المثبت فى الولايات المتحدة الأمريكية ، ويعتبر الشراب الذى ينتج من الهضم الإنزيمى لنشا الذرة أحلى من سكر السكروز ، ويستخدم فى صناعة المشروبات لإضفاء النكهة على المشروبات غيرالمسكرة ، ويستخدم فى صناعة المخبوزات التجارية فى تحلية البسكويت والكعك ، ويمكن أن تحول عملية تجارية كبرى مليونى رطل من نشا الذرة إلى شراب ذرة عالى الفركتوز فى غضون يوم واحد .

وتتطلب عملية تحويل نشا الذرة إلى شراب ، ثلاثة إنزيمات (شكل ٢-٩) ، فالمعالجة بإنزيم alpha-amylase وإنزيم glucomalylase ، يحول أولاً النشا إلى شراب يحتوى على جلوكوز ، بعد ذلك يؤثر أيزوميراز الجلوكوز المثبت على الجلوكوز ، وينتج مزيجًا من الجلوكوز والفركتوز ، الذى يعتبر أكثر حلاوة ، وعلى ذلك يعتبر ذا قيمة أكبر من الشراب نفسه المحتوى على الجلوكوز .

وفى صناعة الألبان ، تعتبر الإنزيمات من العوامل المهمة فى تصنيع الجبن ، ويحتوى اللبن على مجموعة بروتينات تسمى بالكازينات caseins ،

وحد هذه البروتينات هو kappa-casien يمنع اللبن مـن التخـثر فـى وجـود أيونات الكالسيوم ، ويعمل إنزيم الأنفحة rennin ، الذى يتم الحصول عليه تجارياً من الجدار المبطن لمعدة العجول على هدم الكازين وتحويله إلـى بروتين صغير يسمى بـ para - casein . وبمجرد هدم الـ para-casein ، تحدث عملية التخثر لتكوين خثارة لبن ناعمة صلبة ، يمكن فصلها عن الجـزء السائل من اللبن ، وخثارة اللبن هى المادة البادئة فى إنتاج الجبن .

Alpha-amylase, glucoamylase

Glucose

Glucose isomerase

Fructose

شكل ٢-٩ يحضر شراب الذرة عالى الفركتوز ، وهو من المحليات الصناعية المهمة من نشا الذرة بواسطة إنزيمات alpha-amylase ، و glucoamylase، glucose isomerase . والشراب مزيج متعادل من الجلوكوز والفركتوز .

والسائل المتبقى بعد فصل خثارة اللبن هو "مصل اللبن" whey ، ويحتوى هذا المصل من بين عناصر أخرى على بروتينات وسكر غير محلى ولاكتوز، وعلى الرغم من أن هذه المواد ذات قيمة غذائية عالية ، فلم تبتكر حتـى الآن

استخدامات كاملة لمصل اللبن ، لأن العديد من الأشخاص لا يستطيعون هضم اللاكتوز ، وإذا وجد السكر بكميات كبيرة فى الغذاء ، ولم يتحلل أثناء الهضم ، تقوم الكائنات الدقيقة داخل الأمعاء بالتهام اللاكتوز وتحدث غازات تسبب متاعب معوية ، وكان مصل اللبن يمثل فى الماضى مشكلة فى التخلص منه .

وتستكشف الأبحاث الحالية طرق لاستخدام الإنزيمات فى تحويل مصل اللبن إلى مادة يمكن استخدامها كمادة مضافة إلى الغذاء ، وعندما يعالج مصل اللبن بإنزيم اللاكتوز ، فإن اللاكتوز يتحلل إلى اثنين من السكريات الحلوة القابلة للهضم وهما : الجلوكوز والجالاكتوز ، ويمكن إضافة الشراب الحلو الغنى بالبروتين الناتج إلى منتجات غذائية معينة ، مثل الآيس كريم .

ولاحتياج صناعة الجبن إلى مادة الأنفحة rennet - المسحوق الجاف المحتوى على الخميرة المجبنة للبن - بكميات كبيرة ، فقد ابتكرت بدائل لمنتج العجل ، الذى يستخرج منه الأنفحة ، وفى الوقت الحالى ، تستخدم الأنفحة المأخوذة من الكائنات الدقيقة على نطاق واسع ، لكنها تنتج جبنًا ذا جودة منخفضة ، وذلك لأن النشاط الإنزيم الميكروبى يصعب إخماده عن إنزيم العجل، عند الرغبة فى إبطال مفعوله ، وفى الوقت الحالى ، يجرب علماء شركة جينتك Genetech Inc.، بجنوب سان فرانسيسكو فى كاليفورنيا ، طرق لاستنباط أنفحة ميكروبية محسنة ، إحدى هذه الإمكانات هى استخدام أساليب الـ د.ن.أ المطعم فى تعديل الإنزيم الميكروبى المهندس وراثيًا بحيث يقل ثباته، ويمكن إخماد نشاطه بتسخينه لفترة وجيزة فى الوقت المناسب .

وفى صناعة المشروبات beverage industry ، تستخدم الإنزيمات فى العصائر المقاومة للقشعريرة chill-proof juices ، كالنبيذ والبيرة ، وتحتوى العصائر والنبيذ

عنى سكر عديد يسمى بـــالـــ بكتين pectin ،الذى يصبح سائلاً فـــى درجـــة حرارة الغرفة،وحينما يبرد قد يصبح معلق غروى،يكسب السائل مظهراً ضبابياً، ويدل المظهر الضبابى فى أوروبا على علامة الجودة العاليـــة فـــى زجاجـــات عصائر الفاكهة،فى حين يعتبره معظم المستهلكين فى الولايات المتحدة الأمريكية صفة غير مستحبة، ولمنع تكـــون الضباب،تضـــاف إنزيمـــات تســـمى بــــــ pectinases إلى العصير أو النبيذ، ويقوم الإنزيم بهدم البكتين إلى وزن جزيئـــى منخفض، وبذلك تصبح أجزاء العصير أو النبيذ أكثر سيولة، ولا تكون رواسب عند التبريد.

وتحدث مشكلة مماثلة لتكون الضباب أثناء صناعة البيرة،بـــالرغم مـــن أن المركبات المسببة للمشكلة فى البيرة،هى بروتينات وأعفاص tannis بـــدلاً مـــن كونها سكر عديد ، وتصبح البروتينات والأعفاص معلقة فى الجعة، وتترســـب عندما يبرد السائل، وبذلك تكسبه المظهر المعتم . وتضاف بروتيازات للبيـــرة المقاومة للقشعريرة chill-proof beer، مثل البيبسين pepsin أو البابـــاين papain، تهدم البروتينات وتقليل تكون الضباب المسبب للقشعريرة كما يطلقون عليه.

وهناك استخدام آخر للإنزيمات،هو تصنيع الحلويـــات منخفضـــة التركيـــز، وتصنع الملبسات أولاً من ركائز السكروز الصـــلب المحتـــوى علـــى إنـــزيم انفرتاز invertase، وفى غضون مدة تتراوح ما بين ثلاثة إلى أربعـــة أســـابيع، يحول الإنفرتاز السكروز إلى خليط سائل من الفركتوز والجلوكوز، وبالإضـــافة إلى أن الخليط أحلى من السكروز، فإن الفركتوز له ميزة الاحتفـــاظ برطوبـــة أعلى ، بحيث يمنع وجوده أيضاً جفاف الحلوى، ومن أن يكون مـــذاقها غيـــر مستحب.

وتعد الإنزيمات مهمة أيضًا فى تغليف الأغذية ، حيث يمكن دهان الغلاف المصنوع من البلاستيك المستخدم لتغليف الجبن ، على سبيل المثال ، بطبقة من الجلوكوز وإنزيمى جلوكوز أوكسيداز وبروكسيداز ، لمنع الجبن من التلف. وتبطئ هذه الطبقة من نمو النكهة الكريهة ، التى يمكن أن تحدث نتيجة تفاعل الأكسچين مع عناصر الجبن ، وتحت تأثير الجلوكوز أوكسيداز ، يتفاعل الأكسچين بدلاً من ذلك مع الجلوكوز الموجود فى الغلاف البلاستيك ، لتكوين حمض الجلوكنيك وبيروكسيد الهيدروچين ، ويتحول بالتالى إلى ماء بواسطة البروكسيداز ، ولا تؤثر النواتج المتولدة من هذه الطريقة على مذاق الجبن، وبالمثل ، يمكن إضافة أوكسيداز الجلوكوز إلى المايونيز لمنعه من التلف بسبب الأكسدة ، ومقدار الإنزيم المستخدم فى هذه الطرق ضئيل للغاية .

مواد كيميائية بكميات كبيرة

Large volume chemicals

على الرغم من أن أضخم قدر من التحويلات التى تقوم بها الإنزيمات يحدث فى مجال تصنيع الأغذية كما فى حالة تصنيع شراب الذرة عالى الفركتوز ، فإن الإنزيمات تستخدم أيضًا فى تخليق المواد الكيميائية ، ويحتمل أن تكون أهم هذه المواد الكيميائية ، الأحماض الأمينية ، اللازمة لتخليق البروتين وكإضافات غذائية لمرضى المستشفيات ، الذين لا يستطيعون تناول طعامهم بطريقة طبيعية، وكأعلاف للحيوان ، وكوسائط كيميائية .

وعلاوة على ذلك ، تعتمد بعض التحويلات فى مجال التخليق الدوائى على الإنزيمات. وعلى سبيل المثال، فالبنسلين G ، وهوالمضاد الحيوى المنتج

بكتيرية، يتحول عــن طريــق الإنــزيم بنســلين أســيلاز إلــى حمــض ٦-aminopenicillanic ، الذى يعتبر المادة البادئة لإنتاج مركبات البنســيلين شــبه تخليقية (شكل٢-١٠).

Penicillin G

Penicillin acylase

C_6H_5-CH_2COOH + 6-APA

6-APA

شكل ٢-١٠ يحلل إنزيم أسيلاز البنسلين مائيا بطريقة انتقائية ، رابطة أميد السلسلة الفرعية فى البنسلينG المتاحة بسهولة، ويكــون حمض٦-aminopenicillinic (٦-APA)، الذى يعتبر المادة البادئة لتخليق عدد كبير من مركبات البنسلين شبه التخليقية

المنظفـــات

Detergents

أفضل الوسائل المتاحة لإزالة بقع بروتينية، مثل بقع البيض والدم أو النجيل من الملابس، هى إنزيمات البروتياز الهادمة للبروتين، وفى عام ١٩٦٦،أدخل إلى الولايات المتحدة الأمريكية أول منظف للغسالات محتوى علـــى الإنـــزيم ، وفى بداية السبعينات، أدت المخاوف من احتمال أن يكون للإنزيمات الموجـــودة فى المنظفات تأثيرات ضارة، مثل تهيج الرئة، نتيجة استنشـــاق عمـــال هـــذه الصناعة والمستخدمين لها غبار الإنزيم إلى سحب المنظفات من الأسواق، ومع ذلك، ظلت المنظفات تستخدم فى أوروبا،حيث ثبت لهم أمنها وفاعليتها عندما تعد وتتداول وفقاً لطريقة سليمة، ويجرى إعادة إدخال المنظفـــات المحتويـــة علـــى الإنزيم إلى الولايات المتحدة،حيث لا تزيد نســـبة المنظفـــات المحتويـــة علـــى إضافات البروتياز عن ١٥%.

الاستخدامات الطبيـــة

Medical applications

تتحكم الإنزيمات وتجرى عددًا هائلًا من التفاعلات الكيميائية التى تتم داخـــل جسم الإنسان،فهى تتوسط عملية هضم الغذاء، وتبنى عناصر الخلايـــا، وتولـــد وتستجيب لرســـائل ضـــمنخلوية، مثـــل الهرمونـــات والمرســـلات العصـــبية الكيميائية،التى تنقل الإشارات العصبية، وتعد الإنزيمات مفيدة فى كل من دراسة هذه النظم المعقدة وأحياناً فى بعض أنواع العلاج الطبى.وفى أحـــد التطبيقـــات العلاجى البسيطة،يعطى خليطـــاً بســـيطاً عـــن طريـــق الفـــم مـــن إنزيمـــات

ـــريـعـيـة يسمى بـــــ بنكرياتين"pancreatin" كعامل مســـاعد علـــى الهضـــم
ـشــحص الذين يعانون من نقص الإنزيمات الهاضمة،نتيجة لخلل وراثـــى، أو
ـ ـة لمرارة جراحياً ، أو عند تقدم السن.

ويتمثل تطبيق طبى متقدم استخدام إنزيم هباريناز heparinase فى التحكم فى
ـحم لـدم. وغالباً ما يعالج المرضى المصابين بالديلزة الكلوية kidney dialysis
ـ ـ صور معينة من الجراحة، أو المصابين بالنوبات القلبية heart attacks أو
ـــتـت الدماغية، بسكر عديد polysacchride، يســـمى هبـــارين heparin ،
ـعمـ على تقليل قابلية الدم للتجلط، وعلى الرغم من أن العلاج بالهبارين لـــيس
ـضــيـ عادة،إلا أنه قد يكون من الضرورى أحياناً عكس تأثيره بسرعة إذا كان
ـمـريض ينزف بكميات كبيرة،على سبيل المثال . ويمزق الهباريناز الهبـــارين
ـعـو ـرة انتقائية ، ومن ثم يوقف نشاطه، ويحاول الباحثون الطبيـــون اســـتخدام
ـتـريـم الذى يشل حركته على مرشح، لجعل تأثيرات الهبارين المضادة للـــتجلط
عكسـية ، وعندما تصبح هذه الحالة ضرورية، يجرى تدوير دم المريض خارج
ـحسد. عن طريق مرشح بمساعدة الهباريناز المثبت ، ثم يعاد إلـــى المـــريض
ـ هنـك استخدام علاجى إنزيمى ذو إمكانية فعالة هائلة، وهو العـــلاج بمنشـــط
ـسـيج مولد البلازمينوجين tissue plasminogen activator(TPA)،الـــذى يســـاعد
عـى إذابة الجلطات الدموية التى تتكون أثناء النوبات القلبية، فإذا أمكن إذابة أى
حـضة فى وقت مبكر نسبياً،يمكن تلافى الضرر الدائم لعضلة القلـــب، أو علـــى
ـقل، التقليل من تأثيرها .

وفى الماضى، كان يجرى عزل منشط نسيج مولد البلازمـــين مـــن النســـيج
لرحمى البشري human uterine tissue بصعوبة بالغة، وكان ما يتـــوفر منـــه
ـتـطبيقات العديدة ضئيلاً جداً، وعلى الرغم من ذلك ،يمكن أن ينتج حالياً بكميات

كبيرة بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم، ويتوقع أن يكــون أول منتجــات التكنولوجيا الرئيسة الجديدة، الذى يدخل مجال الرعاية الصحية البشرية.

ويتصف الإنزيم بمزية انتقائية عالية high selective ، فهو لا يتعامــل إلا مع الجلطة،ولا يسبب إلا أضراراً طفيفة فى مكان آخر من جسم المريض، وقد جاءت الاختبارات الأولية لــمنشط نسيج مولد البلازمين عند استخدامه فى إعادة فتح شرايين القلب بنتائج طيبة،على شرط أن يبدأ العلاج بســرعة بعــد تكــون الجلطة، وللعديد من الإنزيمات الأخرى التــى تشــمل اليروكينــاز والبــرو-يوروكيناز والاستربتوكيناز تأثيرات مذيبة للجلطة، وقد يكون لها فوائد علاجية للمصابين بالنوبات القلبية،عندما يجرى العلاج بهــذه الإنزيمــات بمفردهــا أو بالاشتراك مع منشط نسيج مولد البلازمين.

وقد بدأ استخدام الإنزيمات فى تعديل البروتينات، وهــو تطبيــق ســتتعاظم أهميته،حيث أصبح يتوفر الكثير من البروتينات التى لها استخدامات طبيــة أو استخدامات أخرى عن طريق تكنولوجيا الــــ د.ن.أ المطعم، وتعتبر الإنزيمات هى الحافزات المؤهلة لهذا الغرض،لأنها تقدم الانتقائية المطلوبة لهــذا المجــال الصعب من الناحية التكنولوجية .

وأول مثال تجارى لتعديل الإنزيم لبروتين للاستخدام البشــرى،هو تحويــل إنسولين خنزيرى porcine insulin إلى إنســولين بشــرى، فمرضـــى البــول السكريDiabetes الذين يضطرون إلى الحقن بالأنسولين للسيطرة على مرضهم، يصابون أحياناً بحساسية ضد أنواع من البروتينات الخنزيرية أو البقرية، لكــن تعبهم يقل عندما يستخدمون الإنسولينات البشرية التى كانت متوفرة بكميات قليلة حتى فترة قريبة.

وعلى الرغم من أن الإنسولينات البشرية والخنزيرية لا تختلف عن بعضها ـ فى حمض أمينى واحد ، فلم تكن تتوفر الطرق الكيميائية لتحويل أحدهما ـحر ، بيد أن ذلك يمكن أن يتم بواسطة الإنزيمات . أولاً ، يطوق الإنزيم حرء الرئيسى من بروتين الإنسولين الخنزيرى ، القريب من الحمض الأمينى غير المرغوب فيه ، وبذلك يزيله على قطعة بيبتيدية صغيرة ، بعد ذلك وفى ظروف تفاعل مختلفة ، يحل إنزيم آخر محل القطعة التى أزيلت ، عن طريق لصق البيبتيد البشرى المماثل مكان الجزىء الخنزيرى المبتور ، والبيبتيد لـترى من النقص بحيث يمكن تخليقه كيميائيًا، والكثير من الأنسولين البشرى، لذى يباع لمرضى البول السكرى فى أوروبا ، هو أنسولين خنزيرى تم تحويله لى تسلسل حمض أمينى بشرى بهذه الطريقة .

وقد بذلت جهود عديدة لعلاج السرطان باستخدام الإنزيمات ، لكنها لم تعط حتى الآن أوجه نجاح كبيرة ، وعلى سبيل المثال ، فالأسباراجيناز asparaginase ، الذى يحول الحمض الأمينى L-asparagine إلى حمض لأسبارتيك ، جرى استخدامه فى علاج مرض سرطان الدم leukaemia ، ويبدو أن لبعض خلايا سرطان الدم متطلبات أعلى من L-asparsgine عن الخلايا الطبيعية ، وكان الأمل فى أن حقن الإنزيم فى الدم ، سيقلل من L-asparsgine المتاح لخلايا السرطان ، ويجعلها تتعطش لمزيد من الغذاء المطلوب ، وقد أثبت العلاج فائدة قليلة ، لأن الزورام غالبًا ما تبدى مقاومة له، وتوجد للـ L-asparsgine تأثيرات سمية جانبية .

الكيمياء التحليلية

Analytical chemistry

الإنزيمات هى أدوات تحليلة على درجة كبيرة من النفع للتطبيقات الطبية وغير الطبية ، وبسبب تخصصها ، فإنه يمكن استخدامها فى اختبار مقدار مادة ، حتى لو كانت لإنزيم آخر ، أو فى خليط معقد مثل الدم أو البول أو السوائل البيولوچية الأخرى ، وغالبًا ما يقترن عدد من التفاعلات الإنزيمية مع بعضها فى محلول ، بحيث يبلغ تسلسل التفاعلات الحفزية الإنزيمية ذروته فى تحويل الـNAD (ثانى نكليوتيد أدنين أميد النيكوتين) إلىNADH ، الصورة المختزلة من الجزىء ، وينشأ عن هذا التحويل تغير فى قدرة العينة على امتصاص الضوء ، الذى يمكن قياسه بسهولة بواسطة سبكتروفوتومتر[١] ، ويعتمد العديد من اختبارات التشخيص التى يقوم بها الأطباء على الإنزيمات ، وتستخدم الأنزيمات بصورة روتينية فى قياس تركيزات الجلوكوز ، واليوريا ، والأحماض الأمينية ، والإيثانول ، وحمض اللكتيك فى السوائل البيولوچية ، وفى التعرف على البروتينات والأحماض النووية .

وغالبًا ما تعتمد أساليب التشخيص المنزلية أيضًا على الإنزيمات ، فعلى سبيل المثال ، يجب على مرضى البول السكرى مراقبة نسبة الجلوكوز فى البول ، كمؤشر لاحتياجهم للأنسولين ، ويجرى تحليل الجلوكوز بسهولة عن طريق غمس عصا اختبار تحليلية فى عينة بول ، وتحتوى العصا على إنزيمات جلوكوز أوكسيداز والبيروكسيداز بالإضافة إلى كاشف ، يسجل التفاعل مع الجلوكوز عن طريق تغير اللون .

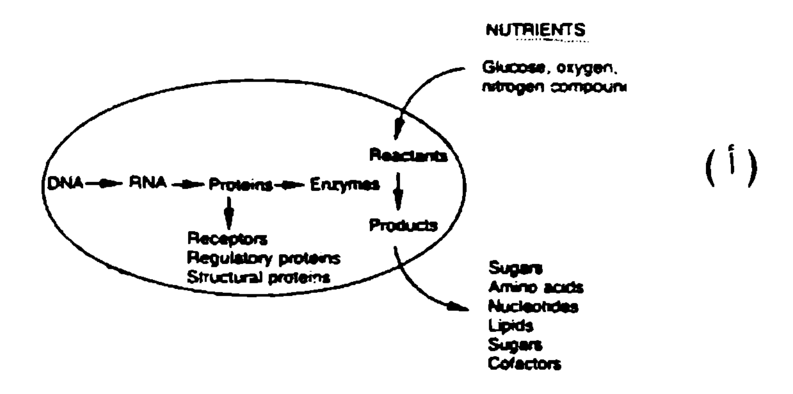
---

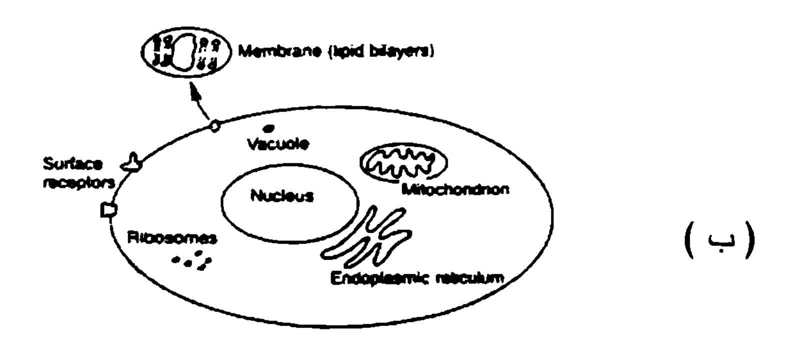
(١) السبكتروفوتومتر : أداة لقياس شدة الضوء النسبية بين مختلف أجزاء الطيف .

استخدامـــات جديـــدة ممكنـــة للإنزيمـــات

Potential new uses of enzymes

تتضمن معظم التطبيقات الحالية للإنزيمات فى الصـــناعة والأبحـــاث علـــى عمليات بسيطة نسبياً،مثل تحويل النشا إلى شراب الذرة العالى الفركتوز، وفـــى المستقبل،قد تستخدم الإنزيمات كحافزات فى الكثير من النظم المعقدة، والعديـــد من الجزيئات المهمة بيولوجياً، المحتوية على سكر عادى، وأحماض أمينيـــة، وبروتينات، على درجة من التعقيد بحيث لا تخلق بســـهولة بواســـطة طـــرق الكيمياء العضوية القياسية، ولما كانت الإنزيمات تعمـــل بصـــورة جيـــدة فـــى التحويلات المتضمنة على هذه المواد، فتسعى جهود البحث الحالية إلى ابتكـــار طرق إنزيمية لتخليقها.





شكل٢-١١ ينظر كل من الكيميائيين والبيولوجيين إلى الخلية بطريقة مختلفة، فالكيميائيون يهتمون بالتفاصيل الجزيئية(أ)، بينما يدرس البيولوجيين الوظائف العامة للخلية(ب).

وسيمثل النجاح فى هذه الجهود خطوة كبيرة نحو تحقيق هدفين، الأول، عندما يتمكن العلماء من الحصول على هذه المركبات البيولوجية المعقدة بسهولة،فسوف يصبحون فى وضع أفضل لفهم الأسس الجزيئية للحياة، ثانياً، ستقدم هذه الصورة الجديدة من التكنولوجيا الحيوية، الأدوات لصنع منتجات مفيدة، ليس فقط للبيولوجيا، ولكن أيضاً للطب والزراعة.

وسوف ينظر الكيميائى المهتم بتحوير الخصائص الخفزية الفريدة للإنزيمات إلى الخلية بطريقة مختلفة عن أى بيولوچى عادى (شكل ٢-١١) ، فالبيولوچى يهتم بتركيب ووظيفة الخلية . وعناصرها ، وبفهم الطريقة التى تعمل بها الأجزاء معًا ، والكيميائى التخليقى يعتبر الخلية كحقيبة من الحفازات الإنزيمية ، التى يمكن أن يوضع بداخلها المواد المتفاعلة ، وسيأتى منها بالمنتجات المفيدة ، وعلى الرغم من ذلك ، يحتاج الكيميائى إلى المعلومات التى يجمعها البيولوچى .

ويتطلب تطوير تكنولوچيا الإنزيم الجديدة ، تصميم النظم التى تنافس تعقيد بعض المسارات الأيضية الرئيسية للخلية . والإنزيمات والركائز ، بالإضافة إلى جزيئات أساسية أخرى تسمى بالعوامل المساعدة cofators ، سوف يتم تجمعيها فى دورات معقدة ، وعند هذه المرحلة ، لا يستطيع أحد أن يعرف بالضبط مدى تعقد هذه لنظم ذات الأيض الصناعى ، بينما لا تزال عملية ، وتهدف أبحاث الإنزيمات الحالية إلى تطوير وتحسين طرق لتجديد العامل المساعد ، واستكشاف وتوسيع مدى التركيبات المقبولة كركائز ، وتخليق الجزيئات الكبيرة التى لا يمكن الحصول عليها بطرق التخليق العادية ، وتطوير نظم للأيض الصناعى ، وإجراء هندسة وراثية للإنزيمات الجديدة أو المتغيرة .

العوامل المساعدة وتخليق الإنزيم المحفز

Cofactors and enzyme-catalyzed syntheses

يمكن تصنيف الإنزيمات بطرق عديدة، إحدى هذه الطرق عن طريق احتياجها للعوامل المساعدة ، وهى المواد ذات الوزن الجزيئى المنخفض التى تساهم أيضاً فى التفاعل المحفز بالإنزيم، فالعامل المساعد NAD، على سبيل المثال،يعمل كعامل مؤكسد فى بعض التفاعلات الإنزيمية،فى حين تعمل صورته المختصرة NADH كعامل مختزل، وهناك عامل مساعد آخر يعمل كواهب لمجموعة فوسفات.

والإنزيمات التى تتطلب عامل مساعد إضافى، تكون بصفة عامة أكثر صعوبة فى الاستخدام فى العمليات التجارية الكبيرة عن تلك الإنزيمات التى لا تحتاج إلى عوامل مساعدة إضافية ، ولما كانت تكلفة العوامل المساعدة مرتفعة- حيث تكلف الـNADH ذات درجة نقاوة ٩٨% حوالى ١١٠٠٠ دولارا للرطل الواحد- فسوف يكون استخدامها مكلفاً بدرجة كبيرة فى تفاعل محفز بالإنزيم،الذى يستهلك جزيئا واحداً من العامل المساعد مقابل كل جزيء يتكون من المنتج.

ويمكن حل هذه المشكلة عن طريق إقران تفاعل تجديد العامل المساعد بالتفاعل الذى يستهلك فيه، وهى استراتيجية تشبه مثيلتها المستخدمة فى الطبيعة، ويحول إنزيم آخر ومواد بادئة رخيصة صورة منتج العامل المساعد إلى صورته المتفاعلة الأصلية، وهناك طريقة لاختزال الـNAD بواسطة ملح حمض الفورميك وفورمات إنزيم dehydrogenase، قام بتطويرها زيف

ـكـ Zeev Shaked وجـورج هوايتســايدش George Whitesides مــن جـمعة هارفارد فى كمبردج ، بولاية ماساتشوستس ، تعتبر مثالاً لنظام تجديـد عـمن مساعد مقترن كهذا (شكل ٢-١٢) .

وحتى تكون نظم تجديد العامل المساعد عملية ، فمن الضـروري أن ـكون قادرينا على تخليق الكواشف المجددة الأساسية بطريقة اقتصــادية ، وصبحت النظم التجديدية العملية متوفرة لثلاثة من أكثر العوامل المساعدة همية ، وهي : ATP و NAD و NADH ، وعلى الرغم من أنــه فــي مكانية النظم حاليًا أن تقدم عدة كيلوجرامات من المنتج ، إلا أنــه علــى ـمستوى الصناعي لم يستخدم منها شيء .

ولبعض الإنزيمات عوامل مساعدة مثبتة بداخلها بطريقة فعالة ، فهي ترتبط ـطريقة قوية بالبروتين الإنزيمي ، وتتجدد كجزء من النشاط الإنزيمي الطبيعي ، ولما كانت لا تتطلب هذه الإنزيمات نظم تجديد عامل مساعد خارجيــة ، فإنهــا تعتبر أسهل في الاستخدام عن تلك الإنزيمات التي تتطلب عامل مساعد إضافي . والتيروسيناز tyrosine الذي يحفز تكوين الحمــض الأمينــي تيروســين ، والتربتوفاناز typtophanase الذي ينتج الحمض الأميني تريبتوفان ، يعتبران مثالاً للإنزيمات المزودة بعوامل مساعدة ،ويمكن صنع أحماض أمينية مختلفة ، عن طريق تنوع الركائز التي تتغذى عليها هذه الإنزيمات .

formate

شكل ٢-١٢ يحول نظام تجديد عامل مساعد مقترن الـ NAD إلى صورته المختزلة (NADH) ، وبما أ إنزيم لاكتات ديهدروجيناز (LDH) يختزل حمض ألفا - كيتوبتريك إلى حمض ألفا - هيدروكسى بتريك ، فإنه يستخدم الـ NHDH ، بعد ذلك يجدد إنزيم فورمات ديهدروجيناز (FDH) الـ NADH بأكسدة حمض الفورميك إلى ثانى أكسيد الكربون .

ولا تتطلب الإنزيمات الأسهل استخدامًا فى التخليق العضوى أية عوامل مساعدة إضافية على الإطلاق ، وينتمى لهذه الفئة الليباز Lipase والألدولاز aldolase ، فالليباز يحفز على شطر روابط الأستر لإنتاج الحمض الحر والكحول ، وركائزه الطبيعية ، هى الفوسفوليبيدات Phospholipides ، وإسترات الحمض الدهنية للجليسرول ، واسترات الكلوسترول والمواد المتصلة بها ، ويمكن أن تعمل أيضًا سلسلة كبيرة من الأسترات التى لا توجد فى الطبيعة ، كركائز لهذا الإنزيم .

والليباز lipase ، هو إنــزيم آخــر ، يمكنــه أن يســاعد علــى عــزل الإنانتيومرات الفردية (شكل ٢-١٣) ،وإذا كان الحمض أو الجزء الكحولى من جزيئة أستر ، له مركز غير متماثل ، فغالبًا ما يشــطر الإنــزيم أســتر أحــد الإنانتيومرات بطريقة أسرع من أستر الإنانتيومر الآخر ، وفى هذه الحالــة ، سوف ينتج التفاعل المحفز بالليباز ، كحولاً أو منتجًا حمضــيًا غنيًــا بســبب الإنانتيومر المنطلق بسرعة أكبر ، وتفيد منتجات كهذه فى التفاعلات التخليقية .

ويحفز الألدولاز aldolase على تكوين كربون - رابطة كربونيــة بــين فوسفات ثنائى الهدروكسى أستون وأى واحد من تشكيلة الألديهيــدات الكبيــرة (شكل ٢-١٤) ، ويجرى حاليًا دراسة التخصص الإنزيمى نحــو الألديهيــدات aldehydes المختلفة والتخصص الملموس للتفاعل .

Ester — Lipase → Asymmetric ester

Asymmetric alcohol

Ester — Lipase → Asymmetric acid + ROH

شكل ٢-١٣ يحفز الإنزيم ليباز على شق الأسترات ، ويطلق الكحول والحمض ، اللذين كانا مرتبطين فى الأصل بجزىء الأستر ، والروابط التى يشطرها الإنزيم محددة بالأسهم ، وكحول الأستر المبين فى التفاعل (أ) له كربون غير متماثل ، ولذلك يوجد فــى أى مــن الصورتين الإنانتيوميريتين ، وفى مثل هذه الظروف ، فقد يشق الليباز الأستر المحتوى على إنانتيومر واحد ، إما بطريقــة بطيئــة أو لا يشقه على الإطلاق ، ويمكن أن يستخدم فى فصل الإنانتيومرات ، ولا يحتوى الأستر المبين فى (ب) على مركز غير متماثل ، فى حــين يخلق الليباز مركز غير متماثل فى الحمض الناتج عن إزالة أحد الكحولين .

Aldehyde + Dihydroxyacetone phosphate → Aldolase

شكل ٢-١٤ يحفز الألدولاز تفاعل ألديهيد وفوسفات ثنائي هيدروكسي أستون ليعطي منتجا ألدوهوليا ذا كيميائية مجسمة معروفة.

توسيـــع نطـــاق ركائـــز الإنزيمـــات

Extending the substrate ranges of enzymes

وكما ذكرنا من قبل ،فإن تخصص الإنزيمات لركائز معينة، هو الأساس فى معظم استخداماتها فى الكيمياء العضوية، ومع ذلك، تتنـــوع درجـــة تخصـــص الإنزيمات المختلفة، فالبعض منها يقبل ركيزة واحدة، بينما يقبل البعض الآخـــر العديد من الركائز ، ويمكن لإنـــزيم الهكســـوكيناز Hexokinase، علـــى ســـبيل المثال،التفاعل مع أكثر من ثلاثين مركباً ، تنتمى مـــن حيـــث التركيـــب إلـــى الجلوكوز، وغالباً ما تقبل الإنزيمات ركائز "غيـــر طبيعيـــة"، لا توجـــد فـــى الطبيعة،بالإضافة إلى الأنواع الطبيعية.

وغالباً ما يوجه برنامج بحثى نموذجى لتخليق الإنزيم المحفـــز إلـــى صـــنع جزيء معين،إما لأنه مهم فى حد ذاته،أو لإمكانية استخدامه كنقطة بدايـــة فـــى تخليق المركبات الأخرى، فإذا كان هناك إنزيم معـــروف بإنتاجـــه لجزيئـــات متشابهة ،فيمكن أن يبدأ البرنامج بإجراء دراسة لسلسلة الركائز التـــى يتعـــرف

عنها ، وتقدم الدراسة فهمًا لكيفية عمل الإنزيم ، وقد تؤدى إلى التنبؤ بركـــائز خرى ممكنة ، ومع ذلك ، فإذا كان الإنزيم لا يعمل بصورة جيدة مع الركـــائز غير الطبيعية مثل عمله مع الركائز الطبيعية ، فقـــد لا يـــزال التحـــول مفيـــدًا وخصوصًا إلا إذا لم يكن من المستطاع صنع المنتج بأية وسيلة أخرى .

وفى المرحلة التالية ، يحدد البحث على نطاق محدود أفضـــل الظـــروف درجات الحرارة ، والأس الهيدروجينى والملح وتركيزات الركيـــزة للتفاعـــل لمحفز بالإنزيم ، فإذا كان تثبيت الإنزيم أمرًا مرغوبًا فيه ، وإذا كـــان تجديـــد العامل المساعد ضروريًا ، فستستنبط نظم مناسبة ، وأخيرًا ، يتم جمع معلومات كافيـــة ، بحيث يمكن أن يجرى التفاعل على نطاق كبيـــر تتطلبـــه العمليـــات التجارية ، وزيادة نطاق التفاعل هذا سيصبح صعب أن لم تؤخذ فى الاعتبـــار المشاكل الموجودة فى هندسة المصنع .

تعديل الأنزيمات

Modification of enzymes

لا توجد حفازات إنزيمية معروفة للعديد من التفاعلات المهمة للكيميـــائيين التخليقيين، وأحيانًا، يميط مسح عشوائى لإنزيمات لم تكن مستكشفة من قبل، أو مصادر إنزيمية، اللثام عن النشاط الحفاز المرغوب، بيـــد أن هـــذه العمليـــة لا تكـــفى وتتطلب مجـــهودًا بشريًا مكثفًا ، ومن أحد الآمال المثيرة فى المستقبل ، تعديل الإنزيمات الموجودة لتغيير أو لتحسين تخصصـــها ، وأكثرهـــا إثـــارة ، إمكانية تصميم إنزيمات جديدة وإنتاجها بواسطة تكنولوچيا الـــ د.ن.أ المطعـــم، على الرغم من أن هذا الهدف متروك للمستقبل البعيد ، ولتحقيق هذا الهـــدف ، فإنه يتطلب معرفة تفصيلية للعلاقات بين تسلسل الحمض الأمينـــى والتركيـــب

الثلاثى الأبعاد للبروتين والتعرف الحفزى والتأثير ، أى من هذه المعلومات غير متاح حاليًا ، على الرغم من أن الباحثين قد بدأوا فى اكتسابها .

ومع ذلك ، فسوف يمضى بعض الوقت قبل أن يتمكن الكيميائيون من تخليق إنزيمات جديدة من لاشيء ، ويعتبر التخليق الكيميائى لإنزيم ككل عن طريق الإنشاء التدريجى لسلسلة الحمض الأمينى أمرًا ممكنًا من الناحية الفنية ، إلا أنه حتى الآن ليس ممكنًا من الناحية العملية ، وتكمن إحدى الصعوبات فى التنبوء بالكيفية التى ينطوى بها تسلسل طولى لأحماض أمينية معينة ، فالأحماض الأمينية لأحد المراكز الفعالة للإنزيم ، التى تعتبر جزء من الجزىء الذى يتصل بالركائز ويؤثر على تحويلها إلى منتجات ، تعتبر بعيدة بشكل متكرر عن بعضها البعض فى سلسلة البروتين الطولية ، ولا ترتبط إلا إذا انطوى الإنزيم على التركيب الفراغى الصحيح .

وهناك صعوبة أخرى تتعلق بتحديد أى الأحماض الأمينية الذى يندمج فى مركز النشاط ، ويمكن أن تقدر النماذج الكمبيوترية مساهمة أحماض أمينية معينة فى ربط الركيزة والحفز ، لكن العول على هذه التقديرات ، قد تم التحقق منه بالتجربة فى حالات قليلة فقط ، ولا يزال مطلوب معرفة الكثير ، قبل أن تصبح للنماذج قيمة تنبؤية فعالة .

وتتجه الجهود البحثية حاليًا نحو تعديل الإنزيمات الموجودة ، فبمجرد أن يتم تحديد الأحماض الأمينية الموجودة داخل أو بالقرب من مركز النشاط الإنزيمى ، فيمكن أن تعدل إما عن طريق التغيير الكيميائى المباشر أو عن طريق التغير الجينى المحدد الموقع ، وتتيح التحويلات الكيميائية لأحد الأحماض الأمينية ، بأن يتحول إلى حمض آخر ؛ أو قد ترتبط مجموعة متفاعلة مع بعض

.حمض الأمينية لتغيير تفاعلية مركــز النشــاط، فعلــى ســبيل المثال،فــإن
ـــى papain وهو بروتيناز قد قــام بتحويلــه د.لـــورانس D. Lawrence وأى.
ـــيز E.Kaiser من جامعة روكفلر إلى بروتين نشط فـــى عمليــات الأكســدة
.الاختزال، وقد قاما بهذا من خلال لصق مجموعة فلافين ب كبريت من بقايا
ـــتين(أحد الأحماض الأمينية)(شكل ٢-١٥)، والفلافينات هى العوامل المساعدة
في تفاعلات الأكسدة-الاختزال التى يحفزها عدد من الإنزيمات.

يمكن تولد الطفرة محدد الموقع الإنزيم عن طريق دمج طفرة معينة فى الجين
المحضر، ويحدد التسلسل الطولى للأحماض الأمينية فـــى البـــروتين الإنزيمـــى
بواسطة التسلسل الطولى للنكليوتيدات فى د.ن.أ الجين، مع النكليوتيدات الثلاث
المكونة لكودون فى كل حمض أمينى(راجع الفصل الأول)، وإذا عرف تسلسل
الجين الذى يشفر عن الأحماض الأمينية لمركز نشاط الإنزيم ، فغالباً ما يمكـــن
استبدال أحد الأحماض الأمينية بآخر،عن طريق تغيير نكليوتيد واحد فقط فـــى
الكودون المناسب.

شكل ٢-١٥ يتحول إنزيم بابين بطريقة كيميائية عن طريق الارتباط بمجموعة فلافين، التى تغير تفاعلية الإنزيم.

والطريقة التى يمكن الوثوق والتنبؤ بها لتعديل الجين المشفر عن بروتين، هى طريقة "تولد الطفرة الموجهة قليلة النكليوتيد" ، وتتضمن هذه الطريقة تخليق جزء صغير من الـــ د.ن.أ (قليل النكليوتيد) يناظر تسلسل الجين الذى ســيطفر ماعدا تغير فى قاعدة معية واحدة ، وعندما يدخل إلى خلايا مناسبة، يعمل قليل النكليوتيد هذا كبادئ لنسخ الـــ د.ن.أ ، وتكون النتيجة أن يندمج التسلسل المتغير فى الجين ، وتتيح صور الاستغلال الأخرى توليد وتحديد وعزل المستنســخات الطافرة التى تنتج الإنزيم المعدل ، الذى غالبًا ما يكون ذا كفاءة عالية .

وقام الآن فريشت Alan Fresht من الكلية الملكية للعلــوم والتكنولوچيــا Imperial College of Science and Technology فى لندن بإجراء هـــذا النوع من الهندسة الوراثية على جين إنـــزيم tyrosyl-tRNA synthetase ، وقد كان من نتيجة ذلك أن غير مخلفات السستين إلى مخلفات سيرين عند الموقع ٣٥ للإنزيم ، والفرق الوحيد بين الحمضين الأمينيين هو أن للسيرين مجموعـــة hydroxyl (-OH) ، فى حين أن للسستين مجموعـــة sulphydryl (-SH) ونتج عن الطفرة تغيرًا فى انجذاب الإنـــزيم enzyme's afifinity لركـــائزه ، لأن الحمض الأمينى المتأثر ، يشارك فى ربط الركيزة ، ويكون السيرين روابط هيدروجينية أقوى من السستين ، وقد تغير عدد آخر من الأحماض الأمينية أيضًا بإنزيم tyrosyl-tRNA aynthetase ، واستخدمت فى استكشاف آليـــة عمـــل الإنزيم .

نظم الإنزيم المتعددة

Multi-enzyme systems

الاستخدام المهم المحتمل للإنزيمـــات ، هو النـــظم الإنزيمية المتعـــددة ، ينما كانت معظم الإنزيمات نشطة تحت نفس الظروف فى الماء عنـــد درجـــة حرارة الغرفة وأس هيدروجينى ٧ تقريبًا – فسوف تبـــدى جميـــع الإنزيمـــات لمختلفة نشاطًا حفازًا عندما تخلط فى نفس المحلول ، وعلاوة على ذلك ، فـــإن تخصصات الركيزة للانزيمات سوف تسمح لكل إنزيم بأن يؤثر على ركـــائزه لخاصة دون تدخل من تأثير الإنزيمات الأخرى ، وإذا كان منتج كـــل تفاعـــل نزيمى هو ركيزة لإنزيم آخر ، فسوف تقترن التفاعلات داخل سلسلة ، بـــنفس لطريقة التى تتكون بها المسارات الأيضية للخلية من سلسلة مـــن التفـــاعلات نمقترنة مبتدئة من المتفاعلات الأولية إلى المنتجات النهائية .

وقد يصطلح على تسمية النظم المصممة معمليًا لمجموعـــات معقـــدة مـــن تفاعلات إنزيمية مقترنة بـــــ "الأيض الصناعى" . بيد أن هذه النظم معقدة من حيث التصميم والتشغيل ، والتحكم الدقيق فى تركيزات الإنزيم بالنسبة لبعضـــه لبعض لإعطاء تركيزات مثالة من المواد الوسيطة فى تسلسل ، وتدوير أى من لعوامل المساعدة الإنزيمية الأساسية يعتبر مسألة مطلوبة لمنع تكـــون المـــواد لوسيطة المعوقة أو استنزاف العوامل المساعدة ، فوجود أى منها ، يمكـــن أن يعيق النظام .

ولا يزال استخدام نظم الإنزيم المتعددة لإجراء التخليق الكلى لجزيئات معقدة حاليًا فى مراحله التجريبية ، أحد الأمثلة على مثل هذا النظام الذى قام بتطـــويره Huey Wong فى معمل هواتسيدز فى هارفـــارد ، يســـتخدم ســـت إنزيمـــات متعاونة لتحـــويل - ٦ - glucose phosphate و N -acetylglucosamine

إليlactosamine وهـو ثنـائى سـكريات، يوجـد كجـزء مـن مجموعـات الكربوهيدرات، التى ترتبط بسطوح بروتينات عديدة.

ونظم الإنزيم المتعددة، المستخدمة فى تخليق كربوهيدرات معقدة، قد تصـبح فى النهاية وسيلة مفيدة لتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، ولا تحتـوى بروتينـات الحيوانات الثديية التى تصنع فى أ.كولاى، والبكتيريا الأخرى بطـرق الـ د.ن.أ المطعم،على الكربوهيدرات التى تحتوى عليه عادة، حيـث لا تسـتطيع البكتيريا إضافة المادة إلى البروتينات ، وإذا ثبت فى النهاية أن الكربوهيـدرات ضرورية للوظيفة الطبيعية للبروتينات، فسوف يجـرى البحـث عـن طريقـة لإضافتها، وقد يساعد الأيض الصناعى فى هذا الخصوص.

عـبرت اقتصادية : المستقبل

Economic considerations : the future

قتصـاديات

Economic

عى الرغم من التعرف على آلاف الإنزيمات ، إلا أن القليل منها يحظـــى ـمـــية تجارية ، فلا يوجد على مستوى العالم ســـوى عشـــرين إنزيمًـــا فـــى ـسوق ، وقدر المكتـــب الأمريكـــى لتقيـــيم التكنولوجيـــا « US Office of Technology Assessment ، أن هذا السوق قد انتج فى عام ١٩٨٥ وحده ، ـ طنًا متريًا من الإنزيمات ، بلغت قيمتها ٦٠٠ مليـــون دولار أمـــــريكى ، يســـتخدم فى الولايات المتحدة أيسومراز الجلوكوز واثنين من الأميلازات لإنتاج ـــرب الذرة العالى الفـــركتوز من نشا الذرة، التى تقدر بحوالى ٥٠% مـــن سوق الإنزيمات ، وقد وفر الشراب للولايات المتحدة حوالى ١,٣ بليون دولارًا فى لتبادل الخارجى من سكر البنجر والقصب فى عـــام ١٩٨٠ ، والإنزيمـــات لأخرى التى يجرى إنتاجها بكميات كبيرة ، الأنفحة التى تستخدم فى صـــناعة لجبن، والبابين المستخدم فى صناعة البيرة المقاومة للقشعريرة ، والبروتيازات لمستخدمة فى المنظمات .

ويعتقد أن يكون احتمال النمو على المدى القصـــير فـــى ســـوق الإنـــزيم لصناعى احتمالاً متواضعًا ، فهنـــاك عدد من التطبيقات الجديـــدة للإنزيمـــات يجرى استكشافها ، فى حين أن عدد العمليات الجارى تطويرها بصورة نشـــطة للاستخدام بكميات تجارية قليل ، ويحتمل أن تتضمن الفرص الأكبر للتفـــاعلات على الماء ، وفى اليابان يجرى استكشاف nitrile hydratase الذى يستخدم فى صنع acrylonitrile و acrylamide فى صناعة اللدائن بشكل نشط ، وللعديد

من تطبيقات الليبازات المستخدمة فى إنتاج الكيماويات الدقيقة ، خصوصًا بالنسبة للوسائط الأنانتيوميرية فى صناعة الأدوية تطبيقات واعدة ، بالإضافة إلى ذلك ، فقد استفيد من الإنزيمات فى التعامل مع مشكلة النفايات السامة الخطيرة ، وعلى سبيل المثال ، فقدابتكرت نظم إنزيمية تجارية للقضاء على أيونات السيانيد فى المخلفات السائلة من المصانع الكيميائية فى الآونة الأخيرة ، ومعالجة المياه من التطبيقات التى نشأت بسبب الضغوط الاجتماعية والتنظيمية .

وبصفة عامة يتصف تطوير التكنولوجيات الجديدة المرتكزة على الإنزيم ، والمستخدمة فى الصناعات الكيميائية بالنمو البطىء والربحية البسيطة فى هذا المجال ، وعلاوة على ذلك ، فإن غالبية المنتجات الحالية للصناعة الكيميائية ، تعتبر منتجات غير قابلة للذوبان فى الماء ، وبذلك لا تعتبر أهدافا نموذجية للتحويل الإنزيمى .

- مستقبل التكنولوجيات المرتكزة علي الإنزيم ، حينئذ ؟

ـي لمدى الطويل فهى ذات مستقبل باهر لأسباب عديدة .

تقدم تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم أسلوبًا جديدًا لتخفــيض تكــاليف إنتــاج ـزيمت النادرة ، وكانت الإنزيمات المستخدمة حتى فتــرة قريبـــة ، هـــى ـزيمت التى يمكن تحضيرها بتكلفـــة رخيصـــة بـــالطرق الميكروبولوجيـــة ـقيـة. وهناك بحث يستهدف استنباط تطبيقات تجارية ترتكــز علـــى هـــذه ـرق. لأنها كانت الطرق الوحيدة التى يمكن أن تتأسس عليها عملية اقتصادية، ـ لة هذا القيد الاقتصادى ، سيسمح للبحث الجـــارى باستكشـــاف تطبيقـــات ـثة. مثل التخليق الكيميائى ، لمجرد أن اعتبرت الإنزيمـــات أدوات البحـــث ـجيدة ، وسوف تنتج أى من هذه الإنزيمات التى تم التعرف عليها بأنها تحمل ـنت مبشرة فى التخليق الاقتصادى بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم .

والموضوعات البيئية بدءًا من معالجة الماء الملوث والتخلص من المخلفات ـعية إلى تطوير طرق تصنيع كيمائية ، التى أدرك المجتمع أنها طرقا آمنة ـعد حاليًا من الاهتمامات الكبيرة ولا تتجاهلها كل الصناعات ، وإن إدراكـــا ـمي بهذه الحقيقة ، يعطى مبررًا لتطوير تكنولوجيات ترتكز علـــى الإنـــزيم معلجة المخـــلفات والتخـــليق الكيميائى ، وحتى لو كانت هـــذه التكنولوجيات ـافس مع التكنولوجيات التقليدية على الإطلاق ، فسوف تفضـــل الطـــرق ـزيمية ، لإن الإنزيمات تعمل فى الماء فى درجات حرارة منخفضة ، وغالبًا ـ يكون لها نواتج ثانوية قليلة .

وتتطلب الصناعة الدوائية على وجه الخصوص ، مجموعة جديدة تمامًا من ـكنولوجيات لكى تتعامل مع الفرص التى تقـــدمها التكنولوجيا الحيوية، والعديد

من المنتجات التى تظهر من التكنولوجيا الحيوية ، هى من الأنواع التى ليست لدى صناعة الأدوية خبرة كبيرة نسبيًا بها ، والدليل على ذلك ، البروتينات مثل البروتين المذيب لتجلط الدم TPA ، وأنترليوكين - ٢ المنظم لجهاز المناعة ، والسكر العدادى مثل حمض الهايلورنيك hyaluronic acid الذى يستخدم فى جراحات العين eye surgery ، وقطع الحمض النووى المستخدمة في تحليل الـ د.ن.أ ويستخدم الإنزيم فى كل أنواع هذه المركبات بشكل فعال . وسوف يتضح الدور المهم الذى يلعبه التخليق الإنزيمى وتعديل المواد. وقد لا تكون قيمة الإنزيمات المستخدمة فى هذه التطبيقات قيمة كبيرة ، فى حين تكون القيمة المضافة للمنتج من خلال المعالجة بإنزيم مناسب قيمة كبيرة .

وحتى بالنسبة للأصناف الموجودة من المنتجات الدوائية ، فسوف تلعب الإنزيمات دورًا متزايدًا فى تقديم الوسائط النقية فى صورة إنانتيوميرية ، وفى القيام بالتحويلات الصحية ذات الانتقائية العالية ، وسوف تدخر الإنزيمات دائما للمهام « الصعبة » وهى الإنزيمات المقاومة للمحلول بالطرق التقليدية ، ويرجع تعقيد الأنشطة الجارية لتطوير الدواء إلى أن المشاكل الصعبة من الأمور المعتادة.

وسوف تستمر تخصصية الإنزيمات فى أن تصبح الطرق التحليلية المفيدة ، فالتطور المستمر وتسويق الإلكترودات التى تحتوى على الإنزيمات المثبتة ، سوف يجعل اختبار العديد من المواد البيولوجية المائية عملاً روتينيًا ، وغالبًا ما تسمح تخصصية الإنزيمات بقياس دقيق لإحدى المواد فى خليط معقد بدون تحضير أية عينات .

وسوف تلعب الإنزيمات دورًا كبيرًا فى تصنيع الأغذية، والدوافع القوية الكبيرة فى هذا المجال ، هى الأمان وتقليل التكلفة ، وتفى الإنزيمات بكلاهما فى

مجالات تطبيق معينة ، ومع أن صناعة الغذاء هى صـــناعة مقاومـــة للتغيـــر تكنولوجيًا ، فسوف يأتى التغيير بشكل بطـــىء ، وتقـــوم معظـــم الصـــناعات الكيميائية على تقليل استهلاك الوقود البترولـــى ، وعلـــى المـــدى الطويـــل ، وخصوصًا فى الدول النامية ستكون هناك مبررات اقتصادية لاستخدام المـــواد الكربونية المشتقة بيولوجيًا ، التى تشـــمل علـــى الســـليلوز والنشـــا واللجنـــين والبروتينات النباتية ، بدلاً من المنتجات البترولية ، ومن المؤكد أن الإنزيمـــات سوف تلعب دورًا فى تصنيع المواد البيولوجية .

إن خطى البحث عن العلاقة بين تركيب إنزيم ونشاطه العقار خطى كبيرة جدًا وعلى الرغم من أن هذه المشاكل تعتبر من المشاكل المعقدة جدًا ، فســوف يصبح من الممكن فى النهاية – ربما فى غضون مـــن ٢٠ إلـــى ٥٠ ســـنة – استنباط بروتينات تحفز أنواع جديدة من التفاعلات وتنتج هذه الإنزيمات غيـــر الطبيعية بطريقة اقتصادية بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم ، وأول تطبيق لهذا النوع من النشاط ، يظهر حاليًا فى صورة برامج متواضعة ، تستخدم تولد الطفرة المحددة الموقع ، فى تعديل خواص الإنزيمات الحالية ، وسوف تتطـــور هذه البرامج بشكل طموح مع مرور الزمن .

الفصل الثالث

الكائنات المجهرية مصادر للمواد الأولية الكيميائية

Microorganisms as producers of feedstock chemicals

الإنتاج الميكروبى للمواد الكيميائية الصناعية من مصادر متجددة

Microbial production of industerial chemicals from renewable resources

تعتبر المواد الكيميائية الأولية هى المواد الخام للصناعة الكيميائية، فهى تستخدم كمواد بادئة لتخليق سلسلة ضخمة من المواد الكيميائية الأخرى - اللدائن والمطاط،على سبيل المثال، وكمذيبات، ولتصنيع منتجات عديدة تشمل المنسوجات والورق(جدول ٣-١).

وكانت المواد الكيميائية الصناعية تنتج فى الأصل من استخلاص مواد من النباتات مثل الزيوت النباتية، والنشا،والسلولوز، والخشبينات[١] ، والشمع، وتتجدد هذه المواد الخام المحتوية على الكربون بصورة مباشرة بواسطة الاختزال التخليقى الضوئى لثانى أكسيد الكربون من الجو، ويمكن أن تتحول هذه المواد كيميائياً إلى مواد أخرى، وبذلك تزيد بدرجة كبيرة من عدد المنتجات التى يمكن الحصول عليها من المملكة النباتية.

١- الخشبين: المادة أو المواد الثلاثية التى تجعل للأعضاء المخشوشبة صلابتها وخصائصها الكيماوية. (المترجم)

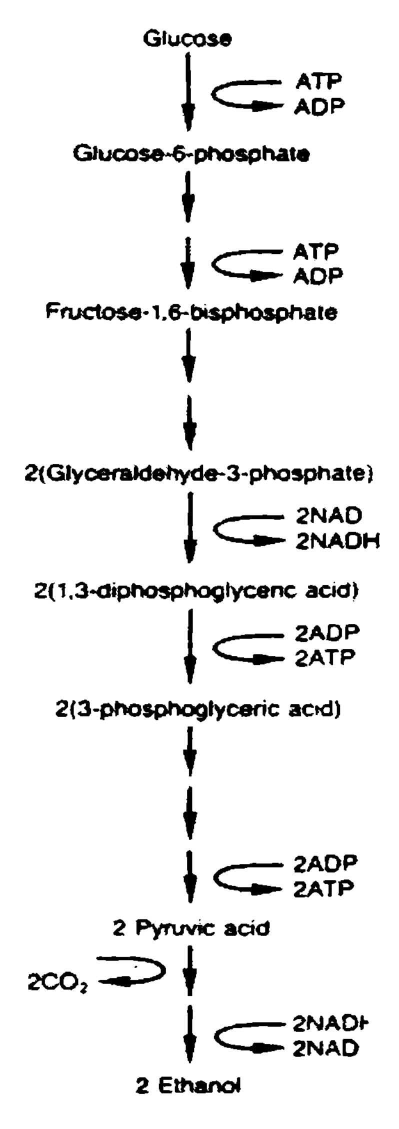
جدول ٣-١. المواد الكيميائية الصناعية الناتجة عن التخمر

Industerial chemicals produced by fermentation

المادة الكيميائية العضوية	المصادر الميكروبية	الاستخدامات المختارة
حمض الفورميك	الرشاشيات	صباغة النسيج،معالجة الجلود،طلاء الكهرباء،تصنيع المطاط
ايثانول	الفطر السكرى	مذيب صناعى،وسيط للخل، إسترات وإيثيرات،والمشروبات
حمض الخليك	باسيلات خلية	مذيب صناعى،وسيط فى العديد من الكيماويات العضوية،مستحمض طعام
حمض الجليكوليك	الرشاشيات	تصنيع المنسوجات، ضبط الأس الهيدروجينى،لواصق،منظفات
حمض الأوكساليك	الرشاشيات	الطباعة والصباغة،عامل تبييض،مختزل
جليسرين	الفطر السكرى	مذيب، ملدن،محلى،تصنيع متفجرات،طباعة،أدوات تجميل،صابون، مقاوم للتجمد
سكر البروبلين	باسيل	مقاوم للتجمد،مذيب،تصنيع الراتنجيات التخليقية، مانع للعفن
أيزوبروبانول	المجزات الغزلية	مذيب صناعى،مستحضرات تجميل،مقاوم للتجمد، أحبار
خلون	المجزات المغزلية	مذيب صناعى،وسيط فى العديد من الكيماويات العضوية
حمض المالونيك	فطر العفن	تصنيع العقارات المنومة والمسكنة
حمض اللبن	العصية اللبنية، المكورات العقدية	محمض للطعام،صبغ، وسيط لأملاح حمض اللبن،دباغة الجلود
حمض الأكريليك	باسيل	وسيط صناعى للدائن
بوتانول	المجزات المغزلية	تصنيع الأسترات
٢،٣ البيوتانديول	البكتيريا الهوائية العصوية	وسيط فى صناعة المطاط المخلق،اللدائن،مقاوم للتجمد
ميثيل اثيل كيتون	الحرشافية الوحيدة(طحلب)	مذيب صناعى،وسيط فى المتفجرات والراتنجات التخليقية
حمض الفيوماريك	جذريات	وسيط للراتنجات التخليقية،الأصباغ،محمض،مقاوم للأكسدة
حمض الكهرميك	جذريات	تصنيع ورنيشات اللك،أصباغ،تصنيع أسترات العطور
حمض التفاح	الرشاشيات	محمض
حمض الطرطريك	باسيلات خلية	محمض،الدبغ،أسترات تجارية لورنيشات اللك ،طباعة
حمض الإيتاكونيك	الرشاشيات	تصنيع المنسوجات والورق،وسيط للدائن

وتقوم الكائنات المجهرية بالعديد من هذه التحويلات، التى يمكنهـا اسـتخدام المواد المستمدة من النبات كمصدر للطاقة لزيادة كتلة الخليـة الميكروبيـة،وفى نفس الوقت تصنع منتجات ثانوية عديدة، ومع ذلك، فدور الكائنات المجهرية لم يقدر حق قدره عند بدء استخدامها لأول مرة فى حفظ الأغذية وإنتاج المشروبات الكحولية، ولم يكتشف العالم الهولندى أنتـونى فـان ليوفينهـوك Antony van Leeuweenhoek البكتيريا إلا فى القرن السابع عشر، وفى القرن التاسع عشر، أقنع العالم الفرنسى لويس باستيرLouis Pasteur المجتمع العلمى بالدور الأساسى الذى تقوم به الكائنات المجهرية فى التخمرfermentation، وعلى مدى العقـود التالية،تم التعرف على منتجات الأيض الميكروبيmicrobial metabolism بمعدل سريع متزايد.

وفى بادئ الأمر، كانت المنتجات تأتى أساسـاً مـن المسـارات الأيضـية للميكروبات المنتجة للطاقة ، وعلى سبيل المثال، يوفر المسار الحـال للسـكر، الإيثانول للمشروبات الكحولية، وثانى أكسيد الكربون لتخمير الخبز، وحمـض اللبن لحفظ الأغذية(شكل ٣-١)، ومع نهاية القرن التاسع عشر، تم التعرف على أحماض عضوية أخرى مثل،حمض الخليك، وحمض البروبيونيـك، وحمـض الليمون بأنها منتجات للأيض الميكروبي products of microbial metabolism.



شكل٣-١. المسار الحال للسكر للتخمرات الكحولية، وفى هذا المسار، يتحول سكر الجلوكوز فى عدة خطوات إلى حمض البيروفيك، الذى يتحول بعد ذلك إلى إيثانول ،ويطلق ثانى أكسيد الكربون.

وفى أوائل القرن العشرين،تبين أن العديد من المــواد الكيميائيــة العضــوية الأخرى منتجات من طاقة الأيض الميكروبى، وأثناء الحرب العالمية الأولـــى،

ابتكرت طريقة التخمير لإنتاج مذيبات الخلون والبيوتانول ، عندما كان الخلون يستخدم لإنتاج مفجر الكورديت(بارود عادم الدخان)، وظهر موقف مشابه خلال الحرب العالمية الثانية،عندما انقطع إمداد المطاط الطبيعى من منطقة الشرق الأقصى، وقد وجد الباحثون آنذاك أن ثانى وثالث البيوتانديول يمكن أن يتحول إلى أول وثالث بيوتاندين، الذى يمكن استخدامه فى صنع المطاط الصناعى، وفى ظهور مسار تخمير لصنع ثانى وثالث البيوتانديول .

ويمكن إرجاع بدايات الصناعة الدوائية الحديثة modern pharmaceutical industry إلى عام ١٩٢٨،عندما اكتشف ألكسندر فليمنج Alexander Fleming البنسلين penicillin،الذى كان أول مضاد حيوى ميكروبى يصنع بطريقة تجارية، ويعد البنسلين واحدًا مما يسمى بالأيضيات الثانوية secondary metabolism،التى لا تعتبر من منتجات أيض الطاقة الميكروبية products of microbial energy metabolism، وبعد الحرب العالمية الثانية، تزايد عدد المنتجات المصنعة من عمليات التخمير الميكروبى بسرعة ليشمل سلسلة متنامية من المضادات الحيوية والأحماض الأمينية لعلف الحيوان والإنزيمات، ويمكن تصنيف سلسلة المنتجات الضخمة التى يمكن صنعها من التخمير الميكروبى microbial fermentation،كما هو مبين بجدول ٣-٢.

جدول ٣ – ٢ تصنيف منتجات التخمر

Classification of fermentation products

الفئة	أمثلة
١ – منتجات نهائية لأيض الطاقة	إيثانول ، حمض خليك ، حمض اللبن ، بيوتانول ، خلون
٢ – عناصر تخزين الطاقة	جليسرول ، جليكوجين ، عديدات سكريد مختلفة
٣ – بروتينات إنزيمات خارج الخلية إنزيمات ضمن الخلية بروتينات غريبة	أميلازات ، سلولوزات ، بروتيازات ، إنزيم الجلوكوز النشوى ، البكتيناز أيزوميراز الجلوكوز ، ليجازات ، أوكسيداز الجلوكوز ، انفرتاز أنسولين ، هرمون النمو البشرى ، هرمون النمو البقرى
٤ – تركيبات الخلية	خميرة الخباز ، مبيدات حيوية حشرية ، بروتين من كائن وحيد الخلية ، مولدات المضادات
٥ – أيضيات وسيطة	أحماض أمينية ، حمض الليمون ، فيتامينات ، حمض الماليك
٦ – أيضيات ثانوية	مضادات حيوية ، جبرلينات
٧ – مواد معدلة كيميائيا	سترويدات ، سوربوز ، جلوكوز

وخلال القرن التاسع عشر والنصف الأول من القرن العشرين ، كان الإنتاج الميكروبى مصدرًا لمعظم الإنتاج العالمى من المواد الكيميائية العضوية ، وفى حين تعتبر المواد الخام عادة الدليل على اقتصاد المنتجات السلعية ، فينطبق هذا أيضًا على المواد الكيميائية العضوية ، وفى عام ١٩٢٠ ، شرعت شركة ستاندرد أول بنيوجرسى Standard Oil of New Jersy فى إنتاج المواد الكيميائية العضوية من البترول ، عندما بدأت تخليق كحول الإيزوبروبيل isopropyl alcohol من البروبلين propylene ، وعلى مدى العقود التالية ، وخاصة بعد عام ١٩٥٠ ، تزايد بسرعة استخدام المواد الأولية البتروكيميائية للتصنيع الكيميائى ، بسبب وفرتها ، وبسبب رخص أسعار البترول ، وارتفاع تكلفة المواد الخام المستمدة من النبات .

وعلى الرغم من وجود مسارات تخمير عديدة للمركبات العضوية،فقد تناقص تخمير بسرعة كمصدر لهذه المواد الكيميائية ،مع أن البعض لا يزال يستمد رجة كبيرة من عمليات التخمير الميكروبية، وتشمل عمليات التخمير هذه على لإيثنولethanol وعدد من الأحماض العضوية والمواد الكيميائية العضوية لأكثر تعقيداً مثل، المضادات الحيوية، التى تتطلب خطوات تخليق متعددة.

ومع ذلك،فلم تغير أسعار البترول فى حقبة السبعينات بشكل فجائى من لتكاليف النسبية للمواد الخام للتخليق الكيميائى والتخميرى فحسب، لكنها رعزعت أيضاً استقرار سوق البترول العالمى، ولهذا السبب،أصبحت المواد لأولية الزراعية مرة أخرى أكثر جذباً، ففى الولايات المتحدة على سبيل لمثال،تم بسرعة إنشاء العوامل المساعدة على التخمير لإنتاج الإيثانول من لجلوكوز الذى يستمد من نشا الذرة، وشرعت البرازيل أيضاً فى القيام ببرنامج ضخم لإنتاج الإيثانول بطرق التخمير، واستخدمت فى هذه الحالة السكروز من لمولاس.

ومع قدوم تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، التى ظهرت أيضاً فى السبعينات، فقد أضافت بعدًا جديدًا آخر لاستغلال الأيض الميكروبى. ويمكن حالياً التوسع فى سلسلة المنتجات التى تصنع من الخلايا الميكروبية، حيث تستخدم الكائنات العضوية كمصانع كيميائية مصغرة لتخليق بروتينات غريبة مثل الأنسولين البشرى وهرمون النمو(انظر الفصل الرابع)، وقد تزيد تعديلات جينية أخرى من كفاءة عمليات التخمير الحالية،أو تعطى الميكروب القدرة على النمو على مصادر طاقة لم تكن مستخدمة من قبل.

المذيبات الصناعية

Industerial solvents

لا يزال يستمد حوالى ٨٠% من الإيثانول المنتج فى العالم من عمليات التخمر، ويأتى الجزء المتبقى إلى حد بعيد من عمليات التخليق من المنتج البترولى الإيثلين، ويستخدم الكحول المنتج فى الولايات المتحدة فى المقام الأول فى المشروبات الكحولية (جدول ٣-٣) ، بيد أن هذا الوضع لا يوجد دائماً فى كل مكان فى العالم،فقد عكفت البرازيل على برنامج كبير لإنتاج الإيثانول للحصول على الوقود، وبذلك خفضت وارداتها البترولية، واعتباراً من عام ١٩٨٤، أنتجت البرازيل ٧,٩مليون طن تقريباً من عمليات التخمر، وحصلت على السكروز كمصدر كربونى من قصب السكر.

جدول ٣-٣. إنتاج تخمر الإيثانول فى الولايات المتحدة الأمريكية

U.S fermentation production of ethanol ١٩٨٤

المنتج	الإنتاج السنوى(مليون طن إيثانول)
البيرة	٢,٢
كحول وقود	١,٦
مشروبات كحولية مقطرة	١.
نبيذ	٠,٥
المجموع	٥,٤

وتزيد الولايات المتحدة من إنتاج كحول الوقود أيضا بدرجة كبيرة ، ويرجع ذلك أساساً إلى الزيادة السريعة فى أسعار البترول خلال فترة السبعينات،والطلب المتلاحق للبحث عن مصادر طاقة بديلة، وفى الآونة الأخيرة،عندما تزايد

ـعـرض العالمى من البترول ولو بصورة مؤقتة ، تم تدعيم برنـــامج الوقـــود ـحوى بسبب الخفض الشديد الذى طالبت به لجنة فيدرالية لمحتوى الرصاص ـى البترول ، وقيمة الإيثانول كمعجل للأوكتان .

ويمكن لعدد من الكائنات المجهرية أن تحول الجلوكوز فى غياب الأكسجين ـى منتجات ثانوية من أيض الطاقة ، التى تشمل بشكل نمطى على كحوليـــات مثـل الإيثانول والأيزوبروبيل والبيوتان وأحماض عضوية قصيرة السلسلة مثل ، حمض الفورميك ، والخليك ، واللبن ، والبروبيونيك ، والزبدى ، والمنتجـــات الأخرى التى يمكن إنتاجها هى : ٢ و ٣ - بيوتانديول والخلون .

ويمكن لمعظم الكائنات المجهرية التى لديها القدرة على الأيض اللاهـــوائى ـ تنتج الإيثـــانول ، غير أن العديد منها لا يستطيع أن ينتج مقادير كبيرة لأنها لا يمكنها تتحمل التأثيرات السمية للكحول على غشاء الخلية ، بيد أنـــه يمكـــن ـعض الكائنات المجهرية أن تجمع تركيزات من الإيثانول ، وبدراسة تاريخية ، كان الميكروب الأكثر استخدامًا هو الخميـــرة - الفطريـــة الســـكرية الجعويـــة Saccharomyces cervisiae - التى يمكنها إنتاج إيثانول تصل نسبته إلـــى ١٠% من حساء التخمير ، وتستطيع هذه الخميرة أن تنمو على سكريات بسيطة مثل ، الجلوكوز وعلى سكروز السكر الثنائى المعروف بسكر المائـــدة ، ومـــن المعروف أن الفطر السكرى مادة آمنة الاستخدام كإضافة للغـــذاء للاســـتهلاك الآدمى ، وعلى ذلك تعتبر مادة مثالية لإنتاج المشروبات الكحوليـــة ولإنضـــاج الخبز .

وفى المسار الأيضى الذى ينتج الإيثانول ، تحول الخميرة أحـــد جزئيـــات الجلوكوز إلى جزيئين من الكحول ، بالإضافة إلى جزيئين مـــن ثانى أكســـيد

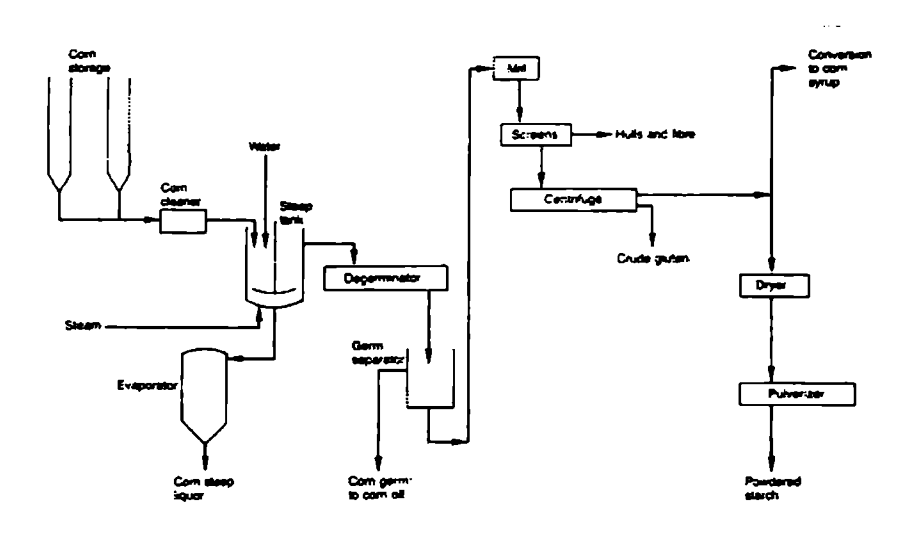
الكربون (شكل ٣-١). ويكتسب الكائن المجهرى أيضاً جـزيئين مـن وسـيط الطاقة، ثالث فوسفات أدنوسين(ATP)، التى يستخدمها للحفاظ علـى الأنشـطة الخلوية الأخرى، وإن لم تنتج كتلة خلوية أخرى، فسيتحول ٥١% من الجلوكوز إلى كحول، ومع ذلك، فإن الناتج الفعلى يكون قريباً من ٤٥%، لتحول بعـض الجلوكوز إلى كتلة خلوية، ونواتج ثانوية مثل،الجليسرول.

وعلى الرغم من أن الإيثانول ينتج أساسا من الجلوكوز والسكروز، إلا أنـه يمكن استخدام سلسلة كبيرة من السكريات الأخرى، ويمكـن الحصـول علـى السكريات من أنواع عديدة من المواد الخام، ويعتبر قصب السكر وبنجر السكر من أكثر المصادر المعروفة للسكروز،فى حين تعتبر أية مادة نباتية محتوية على النشا، ويعتمد ذلك على أسعارها ومحتواها النشوى، مرشحة ممكنة لأن تتحول إلى جلوكوز، وتعتبر الفاكهة أيضا مصادر للجلوكوز والفركتوز، كما هو الحال فى إنتاج أنواع النبيذ المصنوع من الفاكهة، وفى الولايات المتحدة، تعد الـذرة المصدر النشوى المفضل لإنتاج كحول الوقود، ويستخدم مزيج من الحبوب ـ القمح والذرة والشيلم والشعير _ لصنع البيرة والمشروبات الروحية المقطـرة، ويعتبر المولاس مصدر السكر لإنتاج المشروب الكحولى المعروف بالرم.

وعلى الرغم من توجيه قدر كبير من النشاط البحثى نحو تطوير السـلولوز كمادة خام للتخمر، إلا أنه لم يبرهن بعد على أنه المادة الأرخص سـعراالكـى تنافس السكريات والنشويات، وقد استخدم اللاكتوز المستخرج من مـاء الجـبن أيضاً كمادة خام، ومرة أخرى كان نجاحه محدوداً، فلا يوجد مـا يكفـى منـه للعمليات الإنتاجية الكبيرة، ولا توجد أنواع الخميـرة التـى يمكنهـا اسـتخدام اللاكتوز كمصدر للطاقة وتتحمل تركيزات الكحول العالية، وعلاوة على ذلـك،

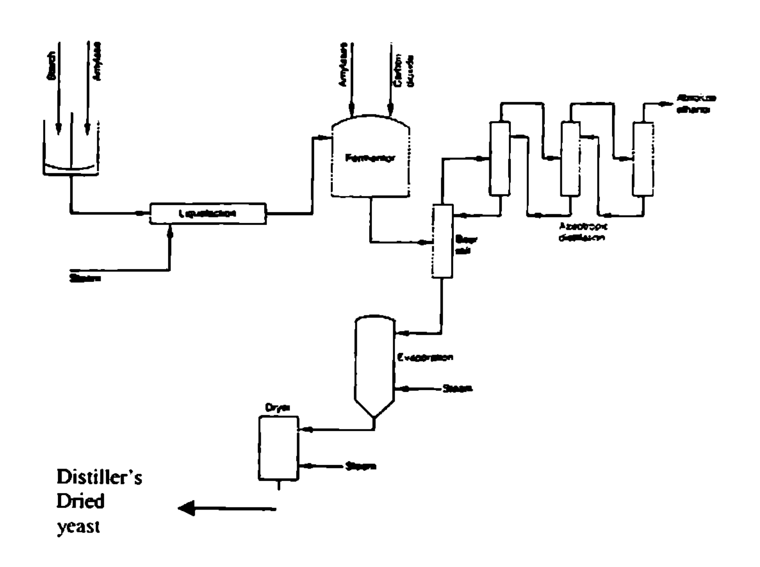
يحتوى ماء الجبن على تركيزات عالية من المعادن المذابة التى تنجح فى إعاقة عملية التخمر.

وعندما تستخدم الذرة كمصدر للنشا لإنتاج كحول الوقـود،يجرى أولاً نــزع الجنين حتى يمكن استخلاص زيت الذرة والبروتين للاستفادة بهما، وعلى سبيل المثال، ففى عملية الطحن الرطب للذرة، يجرى نقع الحبوب لمدة يـومين فـى الماء (شكل ٣-٢)، وبعد ذلك تكسر الذرة الرطبة فـى جهـاز تكسـير نـازع للجنين،ويفصل الجنين بواسطة التعويم. وتترسب بقية الذرة فى القاع، وتـزال الألياف والقشرة الخارجية بطريقة الفصـل، وتفصـل النشـا بعمليـة الطـرد المركزى، ويجرى تميئة التيار المتدفق المحتوى على بروتين الجلوتين، ويجفف المتبقى لبيعه فى صورة علف حيوانى، ويستخلص النشـا بواسـطة الترشـيح الخوائى، وقد يجرى تجفيفه قبل بيعه أو تجرى عليه عمليـة تشـغيل أخـرى لتحويله إلى سكريات قابلة للتخمر.



شكل٣-٢ رسم تخطيطى لعملية الطحن الرطب للذرة. المخطط مشروح بالنص

ولإنتاج الإيثانول ، يجرى تسييل زبد النشا عند درجة حرارة ٩٠ درجـــة مئوية بواسطة إنزيمات ألفا أميلاز التى يمكنها تحمل درجات الحرارة العاليـــة (شكل ٣-٣). ويتم التحول إلى سكريات عند درجات حرارة منخفضة باستخدام إنزيمات الجلوكوأميلاز ، ويتحول ما يقرب من ٩٨% من النشا إلى ســـكريات قابلة للتخمر عن طريق هذه المعالجة ، وبعد ذلك يجرى تخمير السكريات لإنتاج الإيثانول بواسطة سلالات صناعية من الفطريات السكرية الجعوية .



شكل ٣- ٣ رسم تخطيطى للتخمر الصناعى للسكر إلى ايثانول ، المخطط مشروح بالنص .

ويجـــرى استخـــلاص ثانى أكســـيد الكـــــربون المنتج من تفاعل التخمير بواسطة معـــدة تعمل بكفاءة عالية لبيعه كمنتج ثانوى ، وبعد اتمـــام التفاعـــل ، يجرى فصل الخميـــــرة والمواد الصلبــــــة الأخـــــرى من حســـاء التخميـــر بواسطة الطرد المركزى ، وتجفف لبيعها فى صورة علف حيـــوانى ، وينقـــل

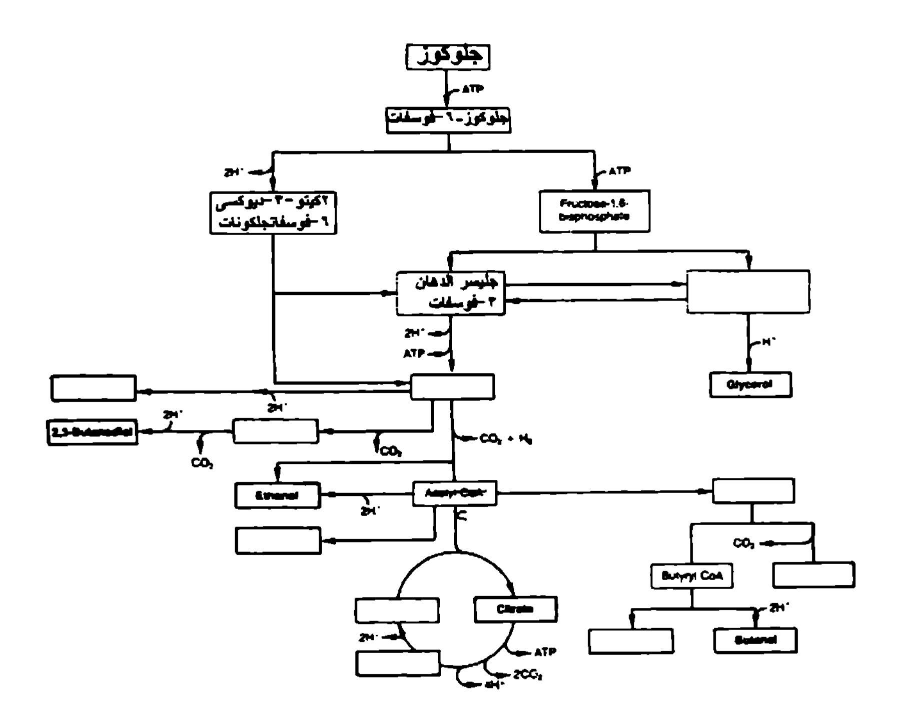
الحساء المصفى إلى معمل تقطير البيرة من أجل استخلاص الإيثانول وتركيـزه جزئيًا ، وهناك تقطير آخر يجرى فى عامود تقطير مقوم يصل بتركيز الإيثانول إلى نسبة ٩٥% ، وهى أقصى نسبة يمكن الحصول عليها من تقطيـر محلـول مائى ، وبعد ذلك ، يزال الماء المتبقى من التقطير الجزئى بواسطة مذيب آخـر مثل ، البنزين ، وبذلك ينتج كحولا نقيًا ، يمكن مزجه بسهولة فى بترول عـالى الأوكتان ، أو يستخدم كمذيب صناعى .

ويحول تخمر الخلون – بيوتانول مواد خام عديدة إلى مادتين كيميـائيتين صناعيتين مفيدتين وإيثانول كمنتج ثانوى ، ويمكن استخلاص الهديروجين وثانى أكسيد الكربون أيضًا كمنتجات ثانوية من معدة إنتاجية عالية الكفاءة ، والسلالة البكتيرية الأكثر استخدامًا لإنتاج الخلون والبيوتانول ، هى المثطبات الخليحويـة اللاهوائية الكاملة Clostridium acetobutylicum ، فى حين أنـه تسـتخدم المثطيات الحيوية C. butylicum بدلاً منها ، وعلى ذلك ، لا يمكـن حـدوث التخمر إلا فى الغياب التام للأكسجين .

وقد تبدأ عملية تخمر الخلون – البيوتانول بمواد أوليـة ، مثـل المـولاس والنشا والسلولوز ومـاء الجـبن (الشرش) ، أو سائل الكبريت النـاتج مـن صناعة الورق كمصادر للجلوكوز ، وتنتفع البكتيريـا مـن وجـود مصـادر نتروجينية معقدة تحتوى على البروتين والفيتامينات بالإضـافة إلـى مصـدر جلوكوزى ، وعلى الرغم من أن وجبة الذرة تعد وجبة نموذجية لاحتوائها على النشويات والبروتينات والفيتامينات ، إلا أنه يفضـل المـولاس ونقيـع الـذرة للعمليات التجارية بسبب رخص أسعارهما .

ويتطلب إنتاج الإيثانول المصنع من الفطرية السكرية الجعوية ، أن يجرى أولاً تمية النشويات إلى جلوكوز بواسطة الإنزيمات ، ومع ذلك ، يمكن لأنواع

المثطيات Clostridium species أن تقوم بهذا التحويل بنفسها، لأنها تنتج وتفرز أثناء نمو الخلية إنزيمات الأميلاز، وبمجرد أن ينطلق الجلوكوز من المادة الخام بواسطة الإنزيمات البكتيرية فإنها تدخل المسار الحـال للسـكر، حيـث تنـتج البيروفات وإستيل كـوانزيم مـع انطـلاق غـازى ثـانى أكسـيد الكربـون الهيدروجين(شكل ٣-٤)، وتكتمل المرحلة الأولى من التخمر بتحول البيروفات والإستيل كوإنزيم إلى الحمض الزبدى وحمض الخليك.



شكل ٣-٤. التفاعلات التى يتضمنها تخمر الجلوكوز إلى بيوتانول وخلون، بحول المسار الحال للسكر الجلوكوز إلـى بيـوفرات، التـى تتحول حينئذ إلى أستيل كوإنزيم ، ويتحول الأستيل كوإنزيم بالتالى إلى عدة منتجات تشتمل الخلون، والبيوتانول، بالإضـافة إلـى عـدة أحماض عضوية.

وفى المرحلة الثانية، تتحول الأحماض المختلطة إلى المذيبات المختلطة مـن البيوتانول والخلون والإيثانول،التى توجد بنسب نهائية حوالى: ٦٠إلى٣٠إلى١٠،

وتنتهى عملية التخمر بعد حوالى ٣٦ ساعة ، عندما يصبح تركيز الإيثانول عاليًا بدرجة كافية لتمزيق غشاء الخلية وإيقاف التفاعلات ، ويتم هذا عندما يصل تركيز البيوتانول ١٢ جرام لكل لتر من حساء التخمير ، وفى نهاية عملية التخمير فان عملية تحول المواد الوسيطة إلى بيوتانول لا تكتمل ، فى حين تبقى سلسلة من المواد الوسيطة (جدول ٣-٤) ، ولما كانت المواد الصلبة المتبقية من حساء التخمير غنية بفيتامين ريبوفلافين ، فمن الاقتصاد استخلاصها لكى تباع كعليقة حيوانية غنية بالبروتين .

جدول ٣-٤. المنتجات النهائية لتخمر الخلون-بيوتانول*
End-products of the acetone-butanol fermentation

المنتج	المثطيات الخلحوية	المثطيات الحيوية
بيوتانول	٢٣	٢٤
خلون	٧	-
إيثانول	٢	-
ثانى أكسيد الكربون	٥٤	٥٠
هيدروجين	٢	١
حمض خليك	٥	٦
حمض زبدى	٢	٨
أسيتوين	٣	-
أيزوبروبانول	-	٤

* يعبر عن النواتج بالجرامات المنتجة من كل ١٠٠جرام من الجلوكوز المستهلك.

الأحماض العضوية

Organic acids

يمكن إنتاج سلسلة من الأحماض العضوية عن طريق التخمـــر الميكروبـــى، وفيما عدا الكحول،كانت هذه الأحمـــاض العضـــوية هـــى منتجـــات التخمـــر الأولى، fermentation production والمثال التقليدى هو حمـــض الخليـــك فـــى صورة الخل، وخلال منتصف القرن التاسع عشر، بدأ إنتاج الحمـــض بطريقـــة صناعية لاستخدامه كمادة كيميائية وسيطة، وتبع ذلك تطوير عمليـــات تخمـــر لصناعة أحماض البروبيونيك والجلوكونيك والليمون واللبن، وفى بداية القـــرن العشرين، أضيفت أحماض الفيومريك والماليك والإيتاكونيك والأكسوجلوكونيك إلى قائمة منتجات التخمر، وطورت أيضاً عملية تخمر حمض الطرطريك، غير أن هذا الحمض أنتج تجاريا كمنتج ثانوى من عمليات تخمر النبيذ.

ومن الأحماض العضوية الأخرى، يعتبر حمض الليمـــونcitric acid منـــتج التخمر الرئيس حاليا، على الرغم من أن كميات لا بأس بها من أحماض اللـــبن والجلوكونيك والإيتاكونيك لا تزال تنتج أيضا مـــن عمليـــة التخمـــر، ويمكـــن الحصول على حمضى الفيومريك والتفاح، أما بواســـطة التخمـــر أو بواســـطة التخليق العضوى، ويتوقف ذلك على تكلفة المواد الأولية، ويـــتم إنتـــاج هـــذين الحمضين حالياً عن طريق عملية الأزمرة والإماهة لحمض الماليكmaleic acid، الذى يصنع بدوره بواسطة الأكسدة الحفزية للهيـــدروكربونات التـــى أساســـها البترول، وبسبب المتطلبات التنظيمية، فلا يزال ينتج حمض الخليك فى صـــورة خل بواسطة عملية التخمر، فى حين يجرى صنع المســـتوى الصـــناعى مـــن

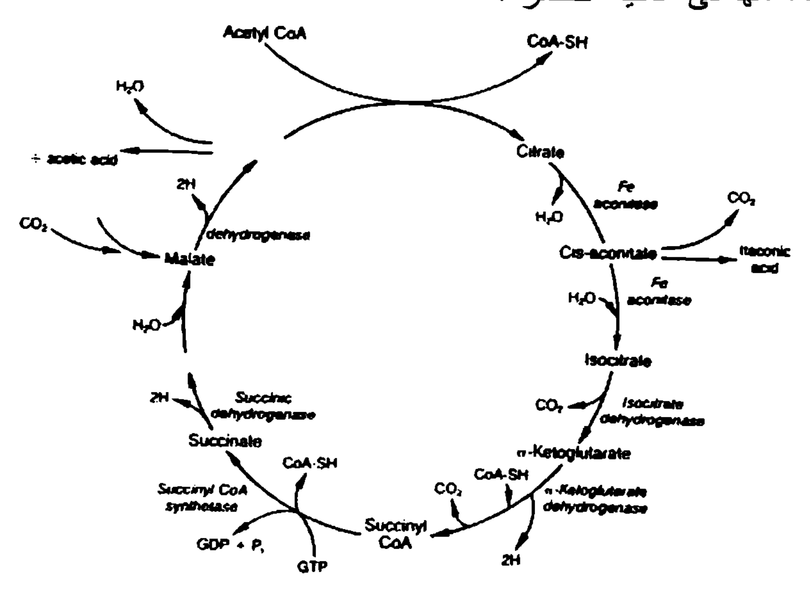
الحمض بواسطة عمليات الأكسدة الحفزية للمواد البتروكيميائيـــة ذات الـــوزن الجزيئى المنخفض، أو بواسطة عملية الحفز الكربونولى للميثانول .

ويستخدم حمض الليمون على نطاق واسع فى الأغذية والمشروبات لإكساب مذاق الحمض والنكهة، ويستخدم صناعياً كعنصر محسن من فاعلية المنظـف، وكمستخلب chelator للمعادن، وكمقاوم للأكسدة. وحتى عام ١٩٣٠، كان يجرى إنتاج الحمض من الفاكهة الحمضية،وبخاصة فى إيطاليا، على الـرغم مـن أن هناك مصدر بديل،ألا وهو التخمر بواسطة الفطريات قد اكتشف فـى أواخـر القرن التاسع عشر. وعلى مدى العقود التالية من تطوير عملية التخمر، اكتشفت أجنـــــاس عديـــــدة مـــــن الفطـــــور تضـــــمنت علـــــى الرشاشياتAspergillus،والعفنPenicillium،وpaecilomyces،والعفنـــةMucor،و ustilin لإنتاج هذا الحمض، وفى الآونة الأخيرة، وجد أن معظم الخمائر والعديد من البكتيريا منتجة جيدة لهذا الحمض.

وقامت شركة فايزر بمدينة جروتون Pfizer Inc. of Grotonبولاية كـونتكى الأمريكية بتحسين إنتاج التخمر لحمض الليمون ، وأنتج بشكل تجارى فى عـام ١٩٢٣،وبعد ذلك أصبحت عملية التخمر السريع العملية الأقل تكلفـة وغمـرت السوق العالمى، وحاليا،يحتاج السوق العالمى من حمض الليمون ما يقدر بحوالى ألف طن مترى، وتقوم شركة فايزر بإنتاج نصف هذه الكمية، وتنـتج معامـل مايلز بمدينة إيلكهارت بولاية إنديانا الأمريكية ربع المنتج الكلى.

ويخلق حمض الليمون بصورة طبيعية كمادة وسـيطة فـى دورة حمـض الكربوكسيل الثلاثية، وهى أحد مسـارات الخليـة الرئيسـة لإنتـاج الطاقـة (شـكل ٣-٥). ويضـاف الكربـون إلـى الـدورة فـى صـورة أسـتيل

كوانزيم acetyl CoA من المسار الحالى للسكر، ونتيجة لــذلك فــإن أى مصدر كربونى يمكن أن يدخل عملية هدم الجلوكوز يمكن اســتخدامه لإنتــاج حمض الليمون . كانت معظم المصادر الكربونية المعروفة سكريات منخفضــة التكلفة مثل السكريات الموجودة فى مولاس البنجر والقصــب ، وفــى الآونــة الأخيرة ، اتضح أن المواد الهيدروكربونية التى تتأكسد بــأنواع مــن الخمــائر Candida إلى إستيل كوانزيم مصادر كربونية جذابة من الناحية الاقتصــادية لاستخدامها فى عملية التخمر .



شكل ٣ -٥ دورة حمض ثانى الكربوكسيل ، تعتبر هذه الدورة أحد مسارات الخلية الرئيســة لإنتــاج الطاقــة ، والخطــوة الأولى ، هى تخليق ملح حمض الليمون من استيل كوانزيم ، وتتطلب الخطوة التالية ، وهى تحويل ملح حمض الليمون إلى cis – aconitate عامل الحديد المساعد ، (Fe) ، وفى الإنتاج الصناعى لملــح حمــض الليمــون توجــه الخطوات عادة إلى إزالة أيونات الحديد من خليط التخمر لمنع cis-aconitate ومن ثم تحسن نواتج حمض الليمون .

كان حمض الليمون ينتج فى الأصل فى أطباق المزرعة بوساطة الفطــور النامية على سطح خليط التخمر، وكان يضاف الأكسجين بواسطة الانتشار الحر،

ومع ذلك، يعطى غمر الفطر فى الحساء فى خزان تخمير مزود بالهواء معدلات إنتاج عالية ، ويعتبر حاليا الطريقة المفضلة ، والفطر Aspergillus ، الـذى كان مستخدمًا منذ بدء إنتاج حمض الليمون ، لا يزال الفطر المفضـل عنـدما تكون الركيزة من السكر .

وأظهرت الأبحاث الأولى على تطوير عملية التخمر الحاجة إلى ركائز نقية للحصول على إنتاج عالى من حمض الليمون وعادة ما يكون للأيونات المعدنية التى تلوث الركائز تأثير ضار ، وهذا ما ينطبق على الحديد بشكل خاص ، الذى يحفز على نمو الخلايا الميكروبية على حساب إنتاج حمض الليمـون ، ويعـد الحديد مطلوب من أجل النمو ، غير أن التركيز المثالى فى التخمير يكون فـى حدود ٠,١ إلى ١٠ أجزاء فى المليون ، ويتوقف ذلك على السلالة الميكروبيـة المستخدمة ، ولا تنتج السترات عادة بشكل مفرط ويطلقها الكائن المجهـرى ، ويؤدى العجز فى الحديـد إلـى إيقـاف دورة حمـض ثلاثـى الكربوكسـيل tricarboxylic acid cycle عند الخطوة التى تتحول فيها السترات إلى -cis aconitate ، ونتيجة لذلك ، تتراكم السترات ، وللعمل على زيادة النـاتج مـن حمض الليمون ، يجرى التخلص من السكريات بواسطة التبادل الأيونى .

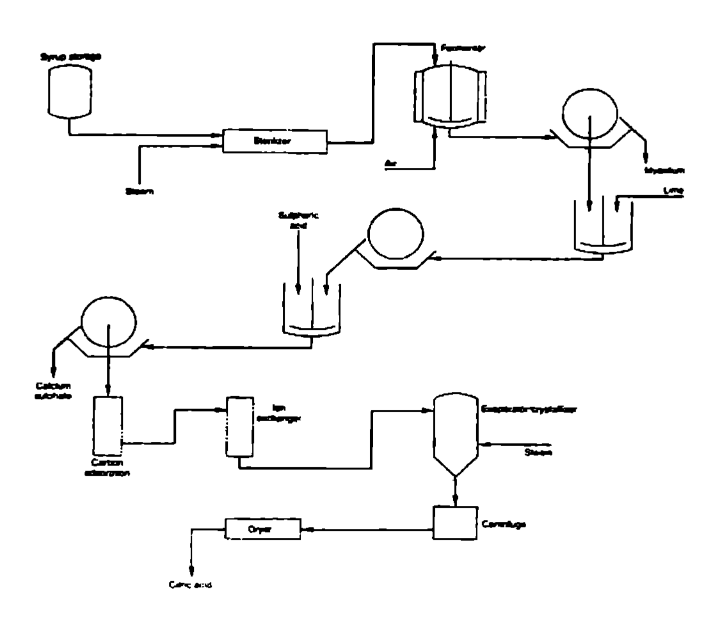
ومع ذلك ، يمـكن لإضـافات أخرى أن تخفـف من تـأثيرات الحديـد السـلبية ، فسـيانيد حـديد البـوتاسـيوم يشـكل ترسـيبات مـن المعـادن النزرة ، ويقـلل تركـيزاتهـا فى وسـط التخمـر ، والتركيـز المـثالى لسـيانيد حـديد البوتاسـيوم لإنتـاج حمـض الليـمـون ، هـو فى حـدود ٠,١ إلى ١ جـرام فى اللـتر ، ويتـوقف ذلك على محـتوى المعدن النزر ،

فى البداية، وبالإضافة إلى ذلك،تحفز كحوليات مثل، الميثيل، والإيثيل والإيزروبيل على إنتاجية حمض الليمون عندما تستخدم بتركيزات تتراوح ما بين ١%إلى ٤ %، والتركيزات الأعلى تكون سامة لنمو الخلية الأمر الذى يؤدى إلى تقليل الإنتاجية، ويمكن للنحاس أيضا معادلة تأثير الحديد، ويحتمل أن يكون ذلك من خلال إعاقته للإنزيم، الذى يحول السترات إلى أكونيتاتaconitate، ويمكن لتركيز نحاس ذى ٥٠٠ جزء فى المليون أن يعادل ما يقرب من ١٠ أجزاء فى المليون من الحديد.

وفى البداية يعالج الشراب المحتوى على السكر المستخدم فى العملية المغمورة لإنتاج حمض الليمون بواسطة تبادل أيون راتنجى موجب الشحنة لإزالة الحديد، وبعد ذلك يعقم ويلقم للمخمر،الذى يكون قد عقم تماماً (شكل٣-٦)، ويجرى إدخال محلول مائى من المواد الغذائية،الذى تم تعقيمه أيضاً إلى المخمر لإمداد التفاعل بالأمونيا والفوسفات والمعادن الأخرى غير الموجودة فى الشراب.

ويتم ضبط الأس الهيدروجينى فى المخمر فى المدى من٥ إلى ٦ ،عندما يكون المولاس هو الركيزة، وأقل من ٣ عندما تستخدم صور أنقى من السكر، وبعد أن تصل درجة حرارة المخمر إلى ٣٠ درجة مئوية،يتم تطعيم محتويات المخمر بالفطرAspergillus nigcr ، ويسمح لعملية التخمر بأن تستمر لمدة تتراوح ما بين أربعة إلى خمسة أيام، وخلال تلك المدة يتحول ما بين ١٢٠ إلى١٥٠ جرام لكل لتر من السكر إلى ما بين ١٠٠إلى١٤٠ جرام من حمض الليمون، وللحصول على أعلى إنتاجية، فإنه يجب الإبقاء على تهوية كافية للحفاظ على سلامة الميكروب نتيجة لنقص الأكسجين.

وفى نهاية عملية التخمر يتم ترشيح حساء التخمير، ويعالج بعد ذلك بـــالجير لرفع الأس الهيدروجينى، ولإزالة ترسيب ملح الكالسيوم من حمـــض الليمـــون، وينتقل الراسب من الروبة بالترشيح ويعاد إذابته بواسطة حمـــض الكبريتيـــك، وبذلك ينتج راسب من كبريتات الكالسيوم، التى تزال بواسطة خطـــوة ترشـــيح أخرى، ويعالج حمض الليمون المحمض بواسطة كربون منشط لإزالة الشوائب الملونة وبواسطة التبادل الأيونى لإزالة الكالسيوم المتبقى والكاتيونات الأخرى، ويتبلر حمض الليمون عند تركيزه فى مبخر، وبعد ذلك تستخلص البلورات من مرشح طارد مركزى ويجفف فى مجفف أتونى دوار.



شكل ٣-٦. رسم تخطيطى لتصنيع حمض الليمون. المخطط مشروح بالنص.

وأحماض اللبن والإيتاكونيك والجلوكونيك، وهى الأحماض التجارية الباقيـــة التى لا تزال تصنع بكميات كبيرة بواسطة التخمر، يتم إنتاجها جميعاً بطريقـــة مماثلة لتخمر حمض الليمون، وتستخدم أنواع من فطر Aspergillus، فيما عدا

حالة حمض اللبن، الذى ينتج بدلاً من ذلك بواسطة أنـــواع مـــنLactobacillus أوStreptococcus، وتتم عمليات التخمر إما بالمولاس كمصدر للسكروز أو النشا كمصدر للجلوكوز، وتصل تركيزات المنتج فى الحمض العضوى بشكل عام فى حدود من ٥ إلى١٠% بالوزن، وعلى الرغم من أن حمض اللبن ينتج فى غياب الأكسجين،فإن جميع عمليات التخمر الأخرى تحتاج إلى الأكســجين للحصـــول على إنتاجية عالية، ويجرى استخلاص أحماض اللبن والإيتاكونيك والجلوكونيك وتنقيتها بطرق مماثلة للطرق المستخدمة مع حمض الليمون.

الأوجه الاقتصادية للتخمر

Economic aspects of fermentation

يمكن اعتبار الكائنـــات المجهريـــة معامـــل كيميائيـــة ميكروســـكوبية،تقوم بامتصاص المواد الخام وتخلق أثناء تكاثرها منتجات كيميائية ، وغالباً ما تصل كفاءة العمليات داخل الميكروبات إلى حوالى ١٠٠%، مـــع إنتـــاج قليـــل مـــن المنتجات الثانوية غير الأساسية.

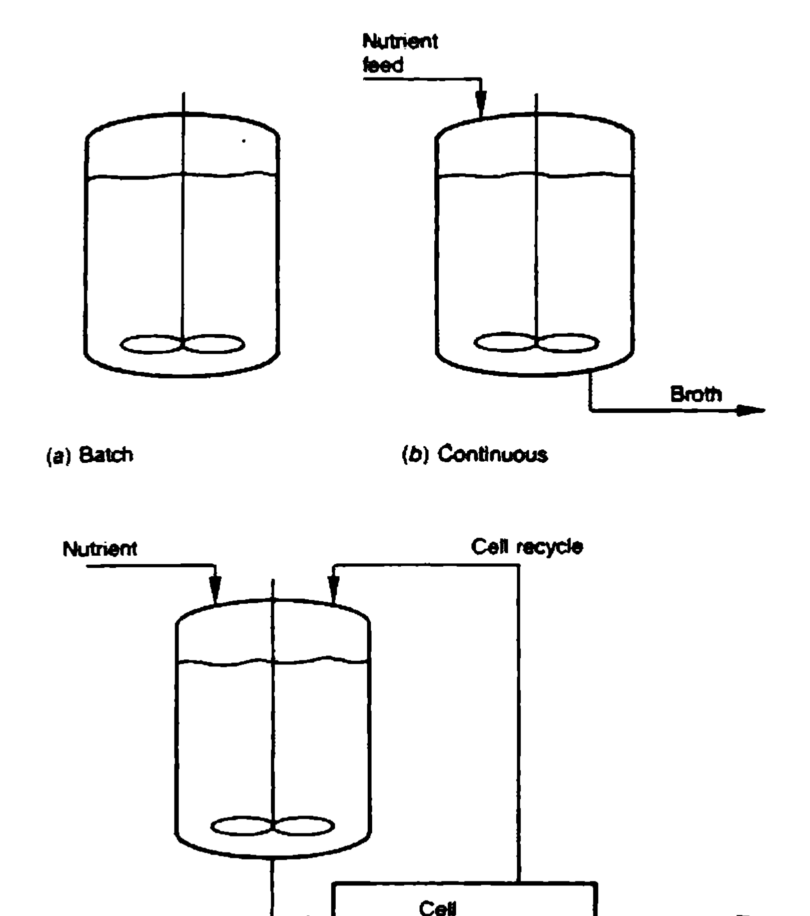
وعلى مدى السنين، تغيرت التكنولوجيا التى تستخدم هذه المعامل الكيميائيـــة الميكروبية تغيراً ملموساً، حيث كانت خلال النصف الأول من القرن العشـــرين تكنولوجيا بسيطة تماماً، وتضمنت عمليات التخمر الأولى الإنتاج غير الهـــوائى للمذيبات فى قدور كبيرة، وحتى هذه الأيام، فغالباً ما ينـــتج الكحـــول الصـــالح للشرب فى خزانات خشبية سعة ٢٠ألف جالوناً، وذات فتحات علوية، ولا توجد بها أجهزة لمراقبة سير تفاعل التخمر، وفى البدايـــة،كانت تجـــرى التخمـــرات الهوائية فى مزارع من الأطباق،وتنمو على سطحها الكائنات المجهريـــة علـــى

طبقة من الحبوب أو منتجات من الحبوب ، وكان يجرى إنتاج أحماض الخليك والجلوكونيك في قواعد من الخشب المسحوج بجعل حساء التخمر ملامسا للهواء.

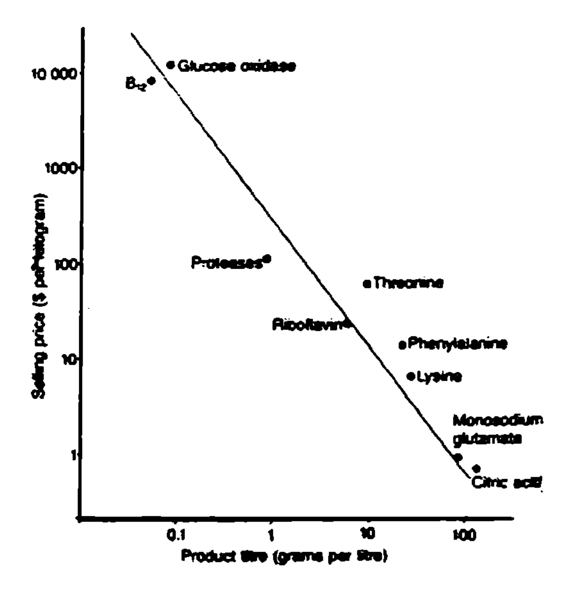
ومع ذلك، فقد أدى إنتاج الخميرة بكميات كبيرة إلى ظهور أوعية التخمر الكبيرة التى يمكن إدخال الهواء إليها، وبمجرد أن ظهرت أهمية البنسلين أثناء الحرب العالمية الثانية، أدى الإنتاج التجارى من هذا المضاد الحيوى إلى إدخال الهندسة الكيميائية الحديثة فى تكنولوجيا التخمر، وحينذاك كانت تصمم أوعية التخمر بشكل روتينى من أجل التعقيم والتحكم فى الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة، على الرغم من أن عمليات التخمر كانت لا تزال تتم "بنظام العبوة"batch mode (شكل ٣-٧).

وفى هذا النوع من العمليات،يجرى تعقيم الوعاء ومحتوياته من المادة الغذائية،ويتم إدخال مادة التلقيح الناضرة من خلايا سريعة النمو،بحيث يتراوح حجم الخلية فى حدود من ١إلى١٠ من محتويات الوعاء الكلية، وبالنسبة للتخمرات الهوائية، فإنه يجرى تقليب الوعاء وإدخال الهواء المرشح، وبعد فترة نمو تصل من٢ إلى ٥أيام، يتم تفريغ حساء التخمر ويرشح للتخلص من الكتلة الخلوية والمواد الصلبة قبل استخلاص المنتج وتنقيته، وفى الآونة الأخيرة،تم تطوير عمليات التخمر لتشمل النوع المستمر، إما بإعادة تدوير الخلايا أو بدونها، ويؤدى ذلك إلى تشغيل المزيد من المادة لكل وعاء مع إنقاص مماثل فى التكاليف الرأسمالية، وأصبح إنتاج المواد الكيميائية بمقادير كبيرة مثل الإيثانول يسيراً بدرجة كبيرة من خلال استخدام النظام المستمر مع تدوير الخلية.

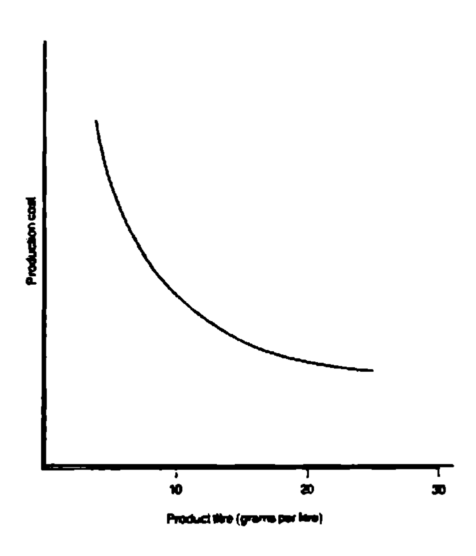
والعوامل الرئيسة التى تؤثر على تكاليف الإنتاج، هى إنتاجيـــة التخمـــر،أى العيار الحجمى للمنـــتج product's titre(تركيـــز حســـاء التخمـــر) لكـــل دورة زمنية،والناتج من المصدر الكربونى، وســـهولة اســـتخلاص recovery المنـــتج وتنقيته، ولما كانت الدورات الزمنية لمعظم التخمرات تتراوح ما بين يومين إلى ثلاثة أيام،فإن الإنتاجية تتأثر بدرجة كبيرة بالعيار الحجمى للمنتج، وعلى مدى سجل أداء أربع دورات، يمكن أن تنسب بصورة مباشرة أسعار سلسلة كبيرة من منتجات التخمر إلى تركيز المنتج فى حساء التخمر (شكل ٣-٨)، ويكون التأثير قوياً بصفة خاصة فى التركيزات الأقل من ٠,١% . وأعلى من تركيـــز ١%، تعتمد تكاليف الإنتاج بدرجة أكبر على المتطلبات الخاصة للمنتج الخاص، ومثال على ذلك،هو تكلفة التخمر لإنتاج حمض أمينى، فعندما يزداد العيـــار الحجمـــى لأكثر من عشرة جرامات للتر، يكون له تأثير متضائل علـــى تكلفـــة الإنتـــاج (شكل ٣-٩).



شكل ٣-٧. ثلاثة أنواع من عمل المخمر، فى نظام العبوة(أ) تمزج الكائنات المجهرية والمواد الغذائية الأساسية فى المخمر إلى أن يصل التفاعل إلى درجة الكمال المطلوبة، وفى تلك الفترة، تسحب محتويات الوعاء ويستخلص المنتج، وفى النظام المستمر(ب) يجرى إضافة محلول المادة الغذائية ببطء فى المخمر بينما يجرى سحب حساء التخمر والمنتج ببطء. وتسمح بعض العمليات للخلايا التى تزال مع الحساء بإعادة تدويرها مرة أخرى فى المخمر(ج).



شكل ٣-٨. تأثير العيار الحجمى على سعر البيع، كلما كان تركيز المنتج عالياً فى حساء التخمر،انخفض سعر البيع.



شكل ٣-٩. تأثير العيار الحجمى للمنتج على تكاليف إنتاج حمض أمينى، ينخفض السعر بسرعة إلى أن يصل العيار الحجمى ١٠جرامات فى اللتر، وبعد ذلك يصبح للزيادات الأخرى تأثير ضئيل على السعر.

وهناك عامل تكلفة مهم ثان ، هو غلة المنتج من المصدر الكربونى ،التـــى تصل بشكل نموذجى فى حدود من ٢٠% إلى ٦٠% من تكلفة الإنتاج الكلية ، وعلى ذلك ، فإن النواتج العالية أمر بديهى للحفاظ على تقليل هـــذه التكـــاليف ، وهذا ما ينطبق بشكل حقيقى على المواد الكيميائية الأقل تكلفة ، ويوضح تحليل تكاليف التخمر لحمض عضوى نموذجى لحصيلتين إنتـــاجيتين مختلفتـــين ، أن تكلفة المادة الخام تنخفض بدرجة كبيرة كلما ارتفعت غلـــة المنـــتج product yield والعيار الحجمى titre (جدول ٣-٥) . بيد أن نسبة المجموع تظل فـــى الغالب دون تغير ، وتنخفض أيضا تكاليف الخدمة بشكل ملحوظ ، لأن النـــاتج الأعلى يؤدى إلى نقص كبير فى حجم المخمر .

جدول ٣ - ٥ تحليل سعر منتج التخمر

الإنتاج السنوى : خمسة مليون رطل

مصدر الكربون : الجلوكوز

العيار الحجمى :	١٠ جرامات / لتر		٤٠ جرام / لتر	
غلة المنتج* :	٣٠%		٦٣%	
مواد خام	١,٥٥	٤٥	٠,٩٣	٤٣
خدمات	٠,٦١	١٧	٠,٢٠	٩
عمالة	٠,٧٩	٢٣	٠,٧٩	٣٦
راس مال	٠,٥٣	١٥	٠,٢٧	١٢
المجموع	٣,٤٨		٢,١٩	

(*) منتج منتجا لكل وحدة جلوكوز مستخدم ، كنسبة من الحد الأقصى النظرى

ويمكن أن تتفاوت تكاليف الاستخلاص والتنقية بدرجة كبيرة، ويتوقف ذلك على المنتج، وبعض المنتجات مثل إنزيم أميلاز المتحلل بالماء، على سبيل المثال، تستخلص ببساطة عن طريق إزالة كتلة الخلية من حساء التخمر، ولا تحتاج إلى تنقية إضافية، ومنتجات أخرى، مثل البروتينات التى توجه نحو الاستخدام العلاجى للمرضى، تحتاج إلى تنقية دقيقة للتخلص من العوامل الملوثة.

أما بالنسبة لمنتج سلعى بسيط مثل حمض عضوى، فقد تصل تكاليف الاستخلاص والتنقية إلى حوالى نصف التكلفة الرأسمالية الاستثمارية ، وحوالى نصف تكاليف التشغيل، ومواد كيميائية صناعية أخرى، تتضمن على الكحول الصرف، الذى يجب أن يقطر،تكون نصف تكاليفه الكلية مرتبطة بعمليات الاستخلاص والتنقية، وتتأثر هذه العمليات بشدة بحجم المعدات، وعلى ذلك يمكن تحقيق وفر كبير فى التكلفة الفعلية من خلال زيادة طاقة الإنتاج القصوى.

وابتليت صناعة التخمر منذ البداية بعدد من المشاكل ، وأهم هذه المشاكل السائدة والمعوقة مشكلة التلوث الميكروبى، فبمجرد أن يصيب كائن مجهرى مهاجم عبوة التخمر، تنخفض غلة المنتج، وقد تصل جودته إلى درجات غير مقبولة، وقد تصبح النتيجة فقد تام لعبوة التخمر الملوثة، ويمكن أن يمثل ذلك ما يصل إلى ١% من الإنتاج السنوى للمنتج،لأنه لا يوجد عادة أكثر من ١٠٠ إلى ١٥٠ عبوة فى السنة، وعلى الرغم من تلوث العديد من التخمرات، إلا أن القليل منها هو الذى يتلف تماما .

ويمكن أن تنتج الفيروسات البكتيرية المسماة بالفيروسات الملتهمة phages نوعاً ثان من التلوث، وعادة ما تظهر عدوى الفيروسات الملتهمة فى صورة انحلال سريع للكتلة الكلية للخلايا المنتجة. وفقد تام للتخمر، والبكتيريا

المستخدمة فى إنتاج الأحماض العضوية والأمينية تعتبر عرضة علـى وجـه الخصوص لهذا النوع من التلوث، ويجب حمايتها عن طريق تشغيل التخمر فى ظل ظروف تعقيم صارمة، وبمجرد أن يحدث التلوث، تظل المعدات المستخدمة تحت خطر متزايد من مشاكل أخرى، ويجب أن يحدد مصدر الملوث بسـرعة، وأن تعقم جميع المناطق المصابة للحماية من مصادر التلوث المتكررة.

وتشكل الطفرات التى قد تظهر بصورة تلقائية فى الكتل الميكروبية نوع ثالث من الملوثات، وكلما ازداد عدد الأجيال خلال دورة واحدة، زاد احتمال ظهـور طائفة فرعية قليلة الإنتاجية، وهذا يعتبر أحد الأسباب الرئيسة الذى يفسر عـدم اتباع عمليات التخمر المستمر للعديد من المنتجات، وكلما جرى تعديل الكـائن العضوى وانتخابه لتكوين منتج عال، يكون العبء الاختيـارى أكبـر للطائفـة الفرعية غير المنتجة من الكائن الدقيق، لأنها ستكون لها الغلبة على العبوة.

وهناك معوق ثان للإنتاج، وهو الحاجة إلى توفير وسائل نقل الأكسجين بقدر كاف للتخمرات الهوائية aerobic fermentation، للحفاظ على معدلات نمو عنـد كثافات خلية عالية، وعندما تبدأ الكتلة الميكروبية فى النمو، يجرى توفير المواد الغذائية بمعدلات مرتفعة جدًا بواسطة الطلمبات، بينما تكـون وسـائل إدخـال الأكسجين أقل كفاءة، ولكى تنمو الكتل الميكروبية بسرعة فـى الأوعيـة ذات السعة الأقل من ١٠٠٠ لتر، يكون القيد الرئيس لنمو الخلية هو الأكسجين، بيد أنه عندما تزيد سعة وعاء التخمر عن ١٠٠٠ لتر، يصبح العامل الأكبر المقيد هـو التخلص من الحرارة، لأن زيادة وعاء التخمر يعنى وجود مساحة سطحية أقـل لكل وحدة حجم من الانبعاث الحرارى، وفى هذه الحالة، يكون نقل الأكسـجين

كاف، بينما لا يكون التخلص من الحرارة كاف للاحتفاظ بدرجة حرارة تخمــر مناسبة.

وتشكل لزوجة حساء التخمر معوق إنتاج ثالث محتمل، فــبعض الكائنــات الفطرية تشكل شبكة من الخيوط تسمى بالفطر الغصينيmycelia ، وعلى الرغم من أن هذه الكائنات، ولو أنها بطيئة النمو، لا تكون مقيدة بتوفر الأكسجين، فإن لزوجة الحساء قد تصبح عالية بدرجة كافية كلما ازدادت كتلة الخليــة، بحيــث يصبح من الصعب ضخ الحساء، وعند هذه النقطة يجب إيقــاف التخمــر، لأن الحساء يجب أن ينقل بالمضخات لخطوات تشغيل تالية.

والمعوق الرابع، هو الحاجة إلى التخلص من عناصر غير المستخدمة فــى حساء التخمر، وتكون كتلة الخلية نفسها عادة أكبر العناصر غيــر المرغوبــة، وقبل أن يتم تحديد التلوث البيئى بأنه مشكلة كبرى،كان يلقى بكتلة الخليــة فــى مقلب النفايات، لكنه بمجرد أن منعت الوكالات التنظيمية هذا الإجراء، كان يــتم معالجة المخلفات بدلاً عن ذلك فى وسائل معالجة فى المواقــع التــى توفرهــا البلديات، وشجع هذا الإنفاق على تطوير مادة المخلفات الصلبة كإضافة عاليــة البروتين لغذاء الحيوان، وقد تحسنت هذه الأيــام معظــم الكائنــات التجاريــة المستخدمة بصورة تجارية لاستخدامها كإضافات غذائية، ويستثنى مــن ذلــك البكتيريا إيريشريا كولايEscherichia coli، التى تعتبر أحد الأنواع البكتيريــة الرئيسة المستخدمة لصنع البروتينات الغريبة، والبكتيريا الأخرى التى تحتــوى على سموم، وبدلاً من الحصول على ميزة٥%إلى ١٠% لكل رطل مــن بيــع الكتلة الخلوية المتبقية من هذه الكائنات، فإن القائم على التصنيع يضطر إلى دفع من ١٠ إلى ٢٠ سنتاً عن كل رطل للتخلص من المادة فى المقالب العمومية.

تأثير تكنولوجيا الـــ د . ن . أ المطعم

The impact of recombinant of DNA technology

اعتقد الاستخدام المبكر للكائنات المجهرية فى التخمـــرات علـــى اختيـــار سلالات معينة موجودة بصورة طبعية ، تنتج المنتجات النهائيـــة المرغوبـــة ، واشتملت هذه السلالات على الخمائر المنتجة للكحول ، والفطريات الموجـــودة بصورة طبيعية التى أنتجت الأحماض العضوية ، وعلى الرغم من أن مسارات الأيض الأساسية لهذه الكائنات العضوية متماثلة فى جوهرها ، إلا أنه طـــورت أنواع عديدة بحيث يمكنها أن تنمو فى ظل ظروف بيئية مختلفـــة مـــن تركيـــز الأكسجين ، والأس الهيدروجينى ، ودرجة الحرارة ، فالأحماض العضوية على سبيل المثال ، تقلل من الأس الهيدروجينى للبيئة المحيطة للمستوى الذى تفضله الكائنات الدقيقة، وتبيد المضادات الحيوية البكتيريا الغريبة التى قد تكون منافسة، ويتيح إنتاج مذيبات ثانوية مثل الإيثانول أن تحافظ الكائنات الدقيقة على التوازن السليم بين الأشكال المختزلة والمؤكسدة للجزيئات التى تساهم فى أيض الطاقة ، وتوفر أيضا القدرة على استخدام ركائز مختلفـــة كمصـــادر طاقـــة المميـــزات التنافسية للميكروبات .

ولمـــا تطـــورت الكائنـــات المجهـــرية لكـــى تبقـــى وتتكـــاثر بســـرعة فى بيئات معينة ، فقـــد أصبحـــت فعـــالة جدًا ، وتنتـــج القليل من المخلفات ، وهذا يعنى من بين أشياء أخـــرى ، أن الخـــلايا تظـــل مسيطـــرة بصـــورة دقيقة على المسارات البيوكيميائية العديدة التى تقوم بها ، وأنها لهـــذا السبب تعتبر ضرورية لإفساد الضوابط الداخلية من أجل زيادة غلـــة المنـــتج ، وغالبًا ما ينشأ الضبط من خلال إيقاف تعبير الجينـــات التـــى تشفـــر عـــن المنتجـــات نفسهـــا ، أو عن الإنزيمـــات المطلوبة لصنع أو هدم المنتجـــات ، ويمكن أن تولد الخلية مستوى أدق من التنظيم عن طريق إيقاف نشاط الإنزيمات بعد أن تصنعها .

وإحدى طرق تمزيق هذه الضوابط الداخلية ، استخدام عدة عوامل طافرة ، مثل المواد الكيمائية أو الإشعاع ، التى تغير د .ن . أ الخلية عند مواقع عشوائية ، وفى غالب الأحوال ، تكون الطفرات المتكونة مشلولة وعديمة الفائدة ، بيد أنه من خلال إطفار وفصل قدر كبير ، يمكن أن توجد الطفرات وبها الـ د. ن . أ ممزق فى مواقع معينة تجعل الخلية تفقد سيطرتها ، إما على تخليق إنزيما مهما فى المسار الذى يصنع منتجًا مرغوبًا ، أو على نشاط الإنزيم ، ونتيجة لذلك ، تنتج الخلية تركيزات متزايدة من المنتج وتفرزه فى البيئة المحيطة ، وعملية الطفر المتبوعة بالاختيار كانت ولا تزال إجراء مجهدا وغير دقيق للحصول على كائن دقيق معين غير منتظم .

وتوفر تكنولوجيا الـ د .ن . أ المطعم طريقة مباشرة لاستغلال أيض الخلية لإنتاج منتجات بيوكيميائية معينة ، وقد برهنت التكنولوجيا على فائدتها العظيمة فى تحديد التسلسلات النكليوتيدية للـ د . ن . أ داخل وحول الجينات ، والتعرف على تلك القطاعات المطلوبة من أجل التحكم فى الجينات أو منتجاتها ، وتشكل هذه القطاعات الأهداف الرئيسية التى يمكن أن تطفر على وجه التحديد أو تلغى أو تغير التحكم فى الجينات ، ويمكن أيضا إدخال جينات جديدة فى الخلايا البكتيرية لإعطائها قدرات تخليق جديدة .

والتأثير الأول لتكنولوجيا الـ د .ن .أ المطعم على الإنتاج الميكروبى للمواد الكيميائية الصناعية سيكون فى الغالب تحسين للإنتاجية ، وتتكون معظم المصادر الكربونية حاليًا من النشويات التى يجب أن تتميأ إلى سكريات بسيطة قبل أن يمكن أن يستخدمها الكائن المجهرى ، ولا تتم عملية التميؤ بالكامل لكنها تترك من ١% إلى ٢% من النشا كدكسترينات حدية limit dextrins ، التى تعتبر سكريات عدادية قصيرة السلسلة تحتوى على نقاط تفرع الجزىء الأصلى ،

وتحتوى النشويات المتميأة أيضا على سلولوز غير متميأ يصل إلى حوالى ١٠% من الكربوهيدرات الكلية .

وإذا أمكن إدخال جينات جديدة تشفر عن إنزيمات لهضم الدكسترينات الحدية والسلولوز إلى كائنات مجهرية صناعية ، فقد يزداد الانتفاع بمصادرها الكربونية بنسبة ٢% إلى ١٠% ، وقد توضح مثل هذه الاستراتيجية الحاجة إلى الحملأة الإنزيمية والكيميائية المطلوبة حاليًا من أجل تحويل سكريات عدادية polysaccharides مثل النشا إلى سكريات ، وقد يسمح إدخال جينات أخرى فى الميكروبات لأن تستبدل مصادر كربونية مثل اللاكتوز من ماء الجبن أو سكريات البنتوز Pentose sugars من الورق وصناعة اللب بالنشا المتمينة، ومن خلال إضافة قدرات جينية جديدة للكائنات الدقيقة التجارية ، فقد تصبح المواد الخام الإضافية منخفضة التكلفة متاحة من أجل التصنيع الكيميائى .

وأحد الأهداف الرئيسة لتطوير عملية التخمر هو زيادة غلات المنتج مع انخفاض تعقيد وتكاليف المواد الخام ، وبعد استخدام القدر الأكبر من المادة الخام للإنتاج المباشر للمنتج النهائى بأقل ما يمكن من تراكم للمنتج الثانوى من الأمور المطلوبة للغاية ، ويكون الأسلوب الأفضل لتقليل هذا التراكم عن طريق فصل النمو عن تكوين المنتج ، بحيث يمكن استخدام الكتلة الحيوية لعدد أكبر من المرات من أجل الغرض الوحيد لتحويل المواد الخام إلى منتج نهائى ، وقد حدث هذا مع إنتاج الحمض الأمينى من خلال تعديل الكائن الدقيق جينيًا لزيادة تركيزات وأنشطة الإنزيمات الضمنخلوية intracellular enzymes التى تخلق المنتج .

وبالنسبة لصور التخليق التى تتطلب تفاعلات مزدوجة الطاقة ، فقد يكــون مستوى أدنى من نمو الخلية ضروريًا للحفاظ على توازن الاختزال - الأكســدة فى الخلية ، وتتضح مصداقية استراتيجية فصل النمو عن تكوين المنتج بشــكل جلى بأمثلة مثل تخمر الخلون - بيوتانول الموضحة سابقا ، التى يقتــرب فيــه الحد النظرى لغلة المنتج من الحمض العضوى الوسيط .

وبعد ثانى أكسيد الكربون ثانى منتج ثانوى كبير فى التخمرات ، وتضــع الرياضيات الكيميائية stoichiometry للتفاعلات داخل الخلية حدًا على مقدار الكربون المتحول إلى ثانى أكسيد كربون ، ويمكن إنقاص هذا القدر فى بعــض الحالات عن طريق إعادة توجيه انسياب الكربون داخل الخلية ، ويمكن إجــراء ذلك من خلال إضافة جينات جديدة للمسارات البديلة التى تسمح باستخدام مــواد خام مختلفة ، ويكون ذلك مجديًا بصفة خاصة إذا كان مصدر الكربون البــديل يلقم فى مسار التخليق عند موقع أقرب للمنتج النهائى عن موقع الدخول بالنسبة للمادة الخام الأصلية ، وقد تكون النتيجة تحســنا ملموســا فــى الحصيلــة الإنتاجية من المواد الكيميائية الصناعية التقليديــة ، وتتــيح أســاليب الهندســة الوراثية الحديثة أيضًا لعمليات الإنتاج العالى لمنتجــات جــديدة بأن تنمــو فى فتــرة أقل من الوقت الذى تتطلبه الأساليب التقليدية للطفر والاختيار .

وبعد تقــليل مــدة دورة التخمر مدخلاً آخر لتحسين التخليــق الحيــوى للمواد الكيمــيائية الصــناعية ، وغــالبًا مــا تنمــو الكائنات الدقيقة المستخدمة فى التخمرات بصــورة بطيئة ولا تجـــمع كميــات كبيرة مــن المنتجــات النهائية إلا بعد أن تصـــل الخلية إلى كــثافة عاليــة ، ويكـــون الزمـــن الكلــى للعمليــة فى صــورته النمــوذجية فــى حـــدود يومــين إلــى أربعــة أيـــام ، يكــون خــلالهـــا التخمر مهــددًا بالتــلوث بالبكــتيريا

الملتهمة أو الغريبة أو الطافرة، وعلى ذلك، فأى إنقاص لدورة التخمر يعطى ميزتان: إنتاجية عالية، وكنتيجة لذلك، تكاليف رأسمالية أقل لكل وحدة منتج، وتقليل لعدد عبوات التخمر التالفة بسبب التلوث.

وقد يمكن زيادة معدلات النمو باستخدام كائن مجهرى سريع النمو مثل،إيريشيا كولاى، وأن تصمم بداخله القدرة على إنتاج المنتج المطلوب، أو، كما ذكرنا من قبل، يمكن فصل مرحلة النمو عن مرحلة الإنتاج، وبمجرد الوصول إلى كثافة الخلية الصحيحة، يمكن أن يتحول الكائن الدقيق من مرحلة النمو إلى إنتاج المنتج السريع عن طريق تنشيط إنزيم رئيس خلال مسار التخليق ومن خلال نمو الكائن الدقيق دون إعاقة، فإنه سيكون فى وضع تنافسى أفضل مع البكتيريا الغريبة والطافرات، ونتيجة لذلك يقل عدد العبوات التالفة بسبب التلوث، وعندما يكون المنتج النهائى ساماً لنمو الخلية،فيكون لهذه الإستراتيجية فائدة إضافية عن طريق السماح للخلايا بأن تصل إلى كثافات عالية قبل تراكم تركيزات المنتج الضارة.

وتولد الحرارة، تعتبر المعوق الرئيس لعمليات التخمر للكميات الكبيرة، ولما كان يجرى تشغيل معظم عمليات التخمر التجارية بالقرب من درجات الحرارة الكامنة،فيلزم للتخلص من الحرارة استخدام المياه المبردة لتبريد أجهزة التخمر والأسطح الكبيرة الناقلة للحرارة، ويمكن لدرجات الحرارة أن ترتفع، ويمكن التخلص من مشكلة الحرارة بدرجة كبيرة، إذا أمكن تطوير سلالات من الكائنات المجهرية المنتجة، التى تتحمل درجات حرارة عالية، وقد يسمح ذلك لدرجة حرارة التخمر بأن ترتفع من ٣٥درجة مئوية إلى ١٠٠درجة مئوية تقريبا، وتستطيع الكائنات الدقيقة المحبة للحرارة أن تنمو فى درجات حرارة عالية كهذه.

وتعد هندسة البروتين protein engineering قوة دافعة رئيسة أخرى للبحث فى الاستغلال الجينى ، ويمكن استخدام أدوات أساليب تكنولوجيا الـ د . ن .أ المطعم لتغيير التسلسل النكليوتيدى mucleotide sequence لأى جين ، وبذلك يجرى تغيير البروتين المناظر ، ويستخدم هذا الأسلوب حاليا فى تغيير أنشطة البروتينات العلاجية الجديدة ، لكنه ذات إمكانات عظيمة أيضا للبروتينات الصناعية الأخرى ، ومن السلع المفيدة للعالم الصناعى ، ألياف الأنسجة والمواد اللاصقة ، والحرير الذى يعتبر كله بروتينا أحد ألياف الأنسجة القوية التى يعرفها البشر ، وقد يكون من الممكن استخدام الهندسة الوراثية فى تغيير تركيب الحرير من أجل تحسين خصائصه المفيدة فعلاً ، وبإدماج جينات لإنتاج الحرير فى كائنات بديلة ، قد يؤدى إلى إنتاجه بتكلفة رخيصة .

وتعتبر المادة اللاصقة ذات الأساس البروتينى ، التى تستخرج من حيوانات قشرية بحرية ، من أقوى المواد اللاصقة المعروفة ، وقد يسمح التعديل الوراثى لحين البروتين اللاصق باستخدم المادة فى مجالات تتدرج من الجراحة وحتى التصنيع ، ويسمح عزل الجينات ووضعه فى كائنات مجهرية مناسبة بالإنتاج التجارى من البروتين بكميات كبيرة .

والخلاصة ، فقد فتحت أدوات تكنولوجيا الـ د.ن . أ المطعم الحديثه حاليًا، إمكانات هائلة لاستغلال المصانع الكيميائية المصغرة القائمة على الكائنات الدقيقة ، وكانت المنتجات الأولى من التكنولوجيا الجديدة ، بروتينات علاجية therapeutic proteins مثل الأنسولين البشرى وهرمون النمو فى مجال الرعاية الصحية ، وسوف يتبعها تطورات فى الإنتاج الميكروبى للأحماض الأمينية والأحماض العضوية الصناعية ، كما ستسمح التحسينات الأخرى باستخدام مواد خام جديدة وتقليل تكاليف الإنتاج .

وبمجرد أن ترتفع أسعار البترول مرة أخرى،فسوف يتبعها بنشاط متواصل تطبيق تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم لإنتاج مواد كيميائية صناعية كالمدونة بجدول ٣-١، وسيكون المجال التالى ذا التأثير الكبير فى تعديل البروتينات والسكريات العدادية، لخلق منتجات جديدة من أجل الاستخدامات الصناعية، وسيضمن القدر الكبير من الجهد العلمى المبذول حالياً على المستوى الدولى بصورة فعلية تحقيق هذه التطورات خلال السنوات الباقية من هذا القرن.

الفصل الرابع:

استنساخ الجين يفتح جبهة جديدة فى مجال الصحة

Gene cloning opens up a new frontier in health

جاءت التطورات الحديثة فى البيولوجيا الجزيئية molecular biology بمجموعة مناهج بحثية قوية وجديدة لاستخدامها فى الأبحاث المتعلقة بالأسرار الجزيئية للحياة، وهذه الأدوات التى قدمت معظمها تكنولوجيات الـ د.ن.أ المطعم والأجسام المضادة أحادية الاستنساخ،تعجل من إحراز معرفة كيميائية حيوية للفسيولوجيا البشرية، ومما له دلالة خاصة ،هو أن تأثير هذه الأساليب التى ساهمت إلى حد بعيد فى إحداث ثورة فى التكنولوجيا الحيوية، يتركز على البحث عن أسباب الأمراض البشرية، فلم تكتف هذه الأساليب فقط بكشف غموض الآليات المعقدة الكامنة وراء الأمراض البشرية، لكنها تفتح أيضاً فى الوقت ذاته جبهات جديدة لتشخيص وعلاج تلك الحالات.

البروتينات والجينات فى البحث العلمى المتعلق بالصحة

Proteins and genes in health research

البروتينات البشرية

Human proteins

كشف الفهم المتعمق للأسس البيوكميائية للحياة عن الأهمية الكبيرة للدور الذى تلعبه البروتينات فى الفسيولوجيا "علم وظائف الأعضاء"physiology (شكل ٤-١). والبروتينات، التى تشكل طائفة الجزيئات الأكثر وفرة فى الكائنات الحية، تؤلف العناصر الإنشائية الرئيسة للخلايا البشرية، وتشمل البروتينات الإنشائية مادة الكولاجين collagen الموجودة بالبشرة والنسيج

الضـــامconnective tissue، ومـــادة الكـــارتينkeratin الموجـــودة بالشـــعر، والميوسينmyosin(الجلوبين العضلى) وأكتينactin (البروتين العضلى) العضلة .

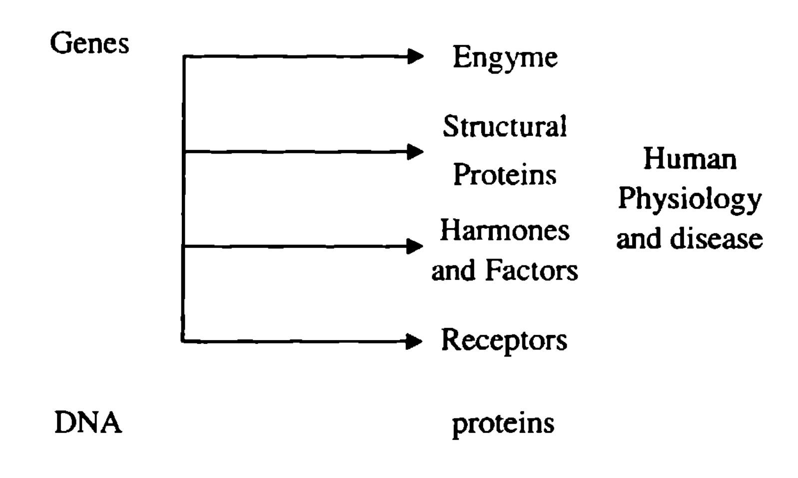
وتلعب البروتينات أيضا أدوارا منظمة رئيسة، فالإنزيمات التى تحفز جميع التفاعلات البيوكميائية فى الخلايا الحية،هى بروتينات، بالإضافة إلى ذلك، فـإن العديد من الجزيئات التى تنقل إشارات منظمة من إحدى الخلايا والأنسـجة أو الأعضاء إلى أجزاء أخرى،هى بروتينات ، وقد كانت هرمونات بروتينية مثـل الأنسولين، والجلوكاجونglucagon(عامـل رافـع لسـكر الـدم)، وهرمـون النمو،معروفة منذ عقود عديدة .

وتشمل البروتينات المكتشفة مؤخرا ، التى تعتبر مهمـة فـى الاتصـالات الضمنخلوية السيتوكوناتcytokines(هرمونـات انقسـام خلويـة) العديـدة – الانترليوكيناتintterleukins، على سبيل المثال – التى تستخدمها خلايا الجهـاز المناعى للاتصال ببعضها ، وعوامل الإطـلاقreleasing factors التـى تـنظم إطلاق هرمونات عدة غدد نخامية pituitary hormones، ومجموعـة العوامـل التى حفز على نمو الخلية، وقد تم عزو العديد من الأنشطة الإضافية الأخـرى حتى الآن إلى عوامل بروتينية غير معزولة وغير مميزة .

والجزيئات العضوية غير البروتينية Non-protein organic molecules التى تشمل السواد الأعظم من الهرمونات والمواد الكيميائية التى تنقل الإشارات فـى الجهاز العصبى،تنقل أيضاً إشارات ضمنخلوية، بيد أن جميع جزيئات التنظـيم الحيوى ، سواء كانت طبيعتها بروتينية أو غير بروتينية ، يجب أن تتفاعل مـع جزيئات معينة يطلق عليهـا المسـتقبلاتreceptors ،علـى أسـطح الخلايـا الترسّيةtarget cells لكى تحدث تأثيراتها، ولما كانت المستقبلات هـى نفسـها

بروتينات ، فإن كل تفاعل منظم بين خلية وخلية يتضمن بروتينيات معينة ، إما أن تقوم بدور الإشارة أو المستقبل أو كلاهما .

وقدمت التكنولوجيا الحيوية مجموعة أساليب قوية لتحليل البروتينات ومن أجل إنتاجها واستغلالها، ونظرًا للدور المحورى الذى تلعبه البروتينات فى جميع أنشطة الخلايا الحية، فإن التأثير القوى لدى التكنولوجيا الحيوية فى إنتاج عقاقير علاجية جديدة، واختبارات تشخيصية قد تم فهمه بسهولة.



شكل ٤-١ . العلاقة بين الجينات والفسيولوجيا البشرية

استنساخ الجين ، والتقدم فى الكيمياء الحيوية للبروتين

Gene cloning and the progress in protein biochemistry

كل بروتين بغض النظر سواء كان إنزيما أم مستقبلاً أو هرمونا أو بروتينًا إنشائيًا ، هو تمثيل مباشر لجين معين ، فالآلية المخلقة للبروتين التى توجد فى جميع الخلايا ، يمكنها أن تحول التسلسل الجينى إلى تسلسل البروتين المناظر وفقًا لقواعد الشفرة الجينية genetic code ، وهذه الشفرة تساوى كودون يتكون من ثلاث نكليوتيدات متتالية فى د . ن أ الجين بأحد الأحماض الأمينية amino acids فى البروتين ، بحيث يَعبر عن تسلسل طولى من نكليوتيدات ثلاثية فى د. ن.أ فى صورة تسلسل طولى معين من الأحماض الأمينية .

قبل حقبة السبعينات ، كانت دراسات الكيمياء الحيوية للبروتين قاصرة تمامًا على إنزيمات وفيرة نوعًا ما ، وعلى بروتينات إنشائية ، وعلى بضعة هرمونات ، وكانت طرق عزل البروتين ووسائل التشخيص المتوفرة فى ذلك الحين طرقًا بدائية بمقاييس اليوم ، ونتيجة لذلك ، فإن العديد من البروتينات المنظمة الحيوية المهمة ، التى كانت تنتج عادة بكميات صغيرة جدا ، إما أنها لم تكتشف ، أو أنها لم تكن تخضع للدراسة ، ولم تكن المعرفة الكاملة بهذا التنوع ولأهمية هذه البروتينات النادرة متاحة .

وقد غير كل ذلك، اكتشاف تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم recombinant DNA والقدرة على استنساخ الجينات، وكما هو متوقع مع ظهور أى تكنولوجيا جديدة ، فإن توفر أساليب الـ د.ن.أ المطعم ، قد حث على تطوير طرق أخرى ، مهدت السبيل لإنجاز الإمكانات الكاملة للتكنولوجيا الأساسية ، وتشمل الطرق

الجديدة التى ظهرت مع تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم، أساليب عزل وتحليــل كميات صغيرة جداً من البروتينات.

وتتيح طرق القياس الدقيقة هذه حالياً ،اكتشاف وتنقيــة وتحديــد تسلســلات الحمض الأمينى للبروتين الموجودة فى الأنسجة بكميات ضئيلة، وعلى الــرغم من أنه منذ حوالى عشرة إلى خمسة عشر عاماً، كان إجراء هــذه التحلــيلات يحتاج بضع مليجرامات من بروتين ، فأصبحت هذه التحليلات تجرى اليوم على مقادير تتراوح ما بين ١/١٠٠٠٠ إلى ١/١٠٠٠٠٠٠ من المقادير السابقة.

وبمجرد أن تنقى كميات صغيرة جداً من بروتين وتشخص بيولوجيا ويتحدد تسلسلها جزئياً، فإن البحث ينتقل إلى استنساخ الجين، ويتيح التسلسل الجزيئــى للحمض الأمينى إنشاء مجس ، يمكن استخدامه فى التعرف على الجــين الــذى يشفر عن البروتين المطلوب، وعندما يستنســخ الجــين،يمكن تحديــد تسلســله الكامل،ومنه يمكن الحصول على التسلسل الكامل للحمض الأمينى. ويمكــن أن يستخدم الجين المستنسخ أيضاً كمجس للتعرف على أيــة جينــات ذات صــلة ومنتجاتها البروتينية.

بالإضافة إلى ذلك يمكن أن يستخدم الجين المكلّون فى إنتاج كميات كبيرة من البروتين المناظر ، والذى سيكون فى جميع الأحــوال تقريبًــا مــن الصــعب الحصول عليها بطرق تنقية البروتين التقليدية . والجمع ما بين أساليب النســب الدقيقة للبروتين واستنساخ الجين وإنتاج البروتين من جينات مَكلوَّنــة قــد أزال بالفعل عزل البروتينات بكميات كبيرة من المصادر الطبيعية . ووضع الأساس

للاستخـدامات الطبيعـية . ووضـع الأساس للاستخدامات الطبية للبروتينـات النادرة سابقًا .

كيف تستنسخ الجينات ؟

How genes are cloned ؟

استنساخ الجين Gene cloning هى تكنولوجيا تحديد وعـزل ونسـخ جـين لبـروتـين معـين ، بغـرض إتاحـة الجين للتحليل ، أو استخـدامه فـى إنتـاج البروتين ، وبصفة عامة ، يتطلب الاستنسـاخ مراحـل ثـلاث : اختيار البروتين أو النشاط البروتينى الذى يرغب من أجله الجين ، والتعـرف على مصدر مادة وراثية تحتوى على الجين المطـلوب ، وابتكار اختبار للجين أو منتجه ، يمكن أن يستخدم فى الكشف عن استنساخ الجين المرغوب .

وعندما يوجد بروتين فى خلية أو نسيج أو كائن عضوى ، فمن المؤكد أن يكون الجـين المشفـر عن ذلك البـروتـين موجـود فى د.ن.أ الخلـوى - وفـى الغالبيـة العظمى من الجينات فى د. ن . أ كـل خليـة من خـلايا الكائن العضوى ، ولتسهيل التعرف على جينـات معـينة ، غالبًـا ما يستخدم الباحثون حينئذ « المكتبات » الجينية Gene library ، التى تعتـبر بنوكـا للجينات المستنسخـة ، والتى تستخـدم كمسـتودعات يمكـن منهـا الحصـول علـى الجينـات ، بطريقة مشابهة للحصـول علـى الكتـب مـن المكتبات العامة .

وقد أعدت المكتبات الجينية من مصادر ميكروبية وحيوانية ونباتية عديدة ، وعلى سبيل المثال، فقد أعد توم مانياتس Tome Maniatis من جامعة هارفارد

بولاية ماساشوستس الأمريكية مكتبة واسعة الاستخدام من الجينات البشرية المستنسخة ، تمثل المادة الجينية الكلية لفرد واحد .

ولإنشاء بنك استنساخ كامل من هذا النوع ، فإنه يجرى أولاً شطر كل المادة الوراثية من خلية أو كائن عضوى إلى قطع بواسطة إنزيم قطع وقصر معين restriction enzyme بعد ذلك ، يجرى إدخال القطع بصورة فردية فى جزيئات الـ د.ن.أ ذات النسخ الذاتى ، والتى تسمى بالمتجهات vectors ، وتكون إما بلازميدات plasmids أو د.ن.أ من مصادر فيروسية، ويتضمن الإدخال فى المتجهات تكوين جزيئات الـ .د.ن.أ المطعمة ، أى مجموعات د.ن.أ من مصادر مختلفة ، وتختار المتجهات التى يمكن مضاعفتها بشكل غير محدود من خلية عائلة ، تكون عادة كائنًا عضويًا ذا خلية واحدة ، مثل البكتير أ. كولاى ، أو خميرة ، أو حيوان مستزرع ، أو خلايا نباتية .

وتنمو حينئذ كل خلية من خلايا العائل host cells ، التى تأوى كل واحدة منها متجهًا يحتوى على قطعة د.ن.أ غربية معينة ، بحيث تكون كل خلية مستعمرة مستقلة ، أى مستنسخ clone ، توفر كل مستعمرة موردًا غير محدود من قطع الـ د.ن.أ التى اكتسبتها من مستعمرة الخلية الأم ، ويتكون بنك الاستنساخ ، أو المكتبة من مجمع من كل خلايا العائل ، التى يؤوى كل منها متجهًا يحتوى على قطعة د.ن.أ غريبة معينة ، وفى مجموعها ، تحتوى خلايا العائل على معظم أو كل المعلومات الوراثية من المصدر الخلوى الأصلى للـ د.ن.أ الغريب .

ويحتوى نوع آخر من البنوك الجينية على نسخ د.ن.أ الجينات ، التى لا يعبر عنها بفاعلية إلا فى خلايا معينة ، هذه البنوك المعبرة عن نسيج معين ،

التى تصنع من نسخ جزيئات ر .ن . أ رسول فى نوع من الخلية فى جزيئـــات الـــ د. ن . أ، تحتوى على مستنسخات جينية أقل من البنوك التى تشـــكل الـــ د.ن.أ الكلى لكائن معين ، ومع ذلك ، فلا تزال تـــدخل جزئيـــات الـــــ د.ن.أ المنسوخة فى متجهات تسمح بنسخ الجزئيات المطعمة فى خلايا عائل مناسبة .

وقد أتاح استخدام تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم إنتاج كميات كبيرة مـــن أى جين لأى كائن عضوى فى أى بيئة خلية عائل تقريبًا ، والتحـــدى القـــائم هـــو العرف على الجين المرغوب ، الذى يشبه تمامًا البحث عن إبرة فى كومة قش . والتشبيه مناسب تماما لأن الإبرة (الجين المرغوب) ، يجب أن تكون موجودة فى القش (مكتبة المستنسخات) ، إذا اختيرت خلايا معينـــة كمصـــدر للمـــادة الوراثية المستخدمة فى تكوين المكتبة .

وتحتـــــوى مكتبة الاستنســـاخ البشـــرية ، التى تتكـــــون من قطـــــــع بحجــــم الجين من الـــ د. ن . أ الكرموسومى البشرى فى خلايـــا أ. كـــولاى على مليون أو أكثر من المستنسخـــات المختلفـــة ، ولولا وجـــود الجيـــــنات البشـــرية فى البـــكتيريا ، فلا يمـــكن تميـــيز الخــــلايا عـــن بعضهـــا البعـــض ، ولســـوء الحظ ، فإن مكتبة الاستنساخ لا يتوفر بها نظـــام ديـــوى العشرى Dewey Decimal System (تصنيف الجينات) للبحث عن الجين الصحيح .

التعـــرف على هويــــة مستنســـخ الجيـــن المرغوب

Identification of the desired gene clone

يمكن تقسيم الطرق الرئيسة للتعرف على جين بروتين معين من بنك استنساخ إلى ثلاث فئات، وتتوقف على ما إذا كان يستخدم اختبار الجين معلومات تسلسل البروتين،أو النشاط البيولوجى لمنتج الجين، أو أجسام مضادة معينة يمكـــن أن تكشف عن وجود المنتج الجينى(شكل ٤-٢).

- **DNA probe assay**

  Based on partial sequence of protein

Human gene expression library ➤ • **Immunological assay** ➤ Gene clone for desired protein (~1 of 1 000 000)

  Based on antibody test specific for protein

- **Biological assay**

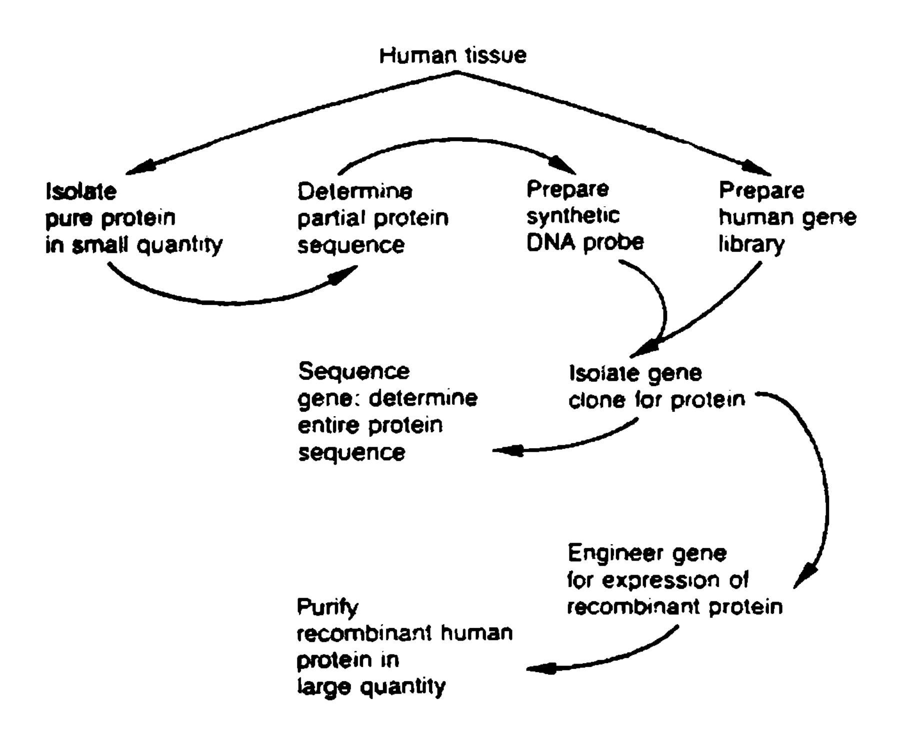
  Based on intrinsic activity of protein

شكل ٤-٢ . طرق التعرف على جين معين فى "المكتبة"، إن التعرف على الجين المرغوب يكون عادة الجزء الأكثر صعوبة فـى عمليـة الاستنساخ، تتكون المكتبة الجينية من عديد-ربما يصل إلى المليون - من مستنسخات الخلايا المختلفة ، تحتوى كل منها علـى قطعـة د.ن.أ من مادة المصدر، وقد يكون الجين المطلوب موجود فى مستنسخ واحد فقط أو عدة مستنسخات على الأكثر ، وتشبه المشكلة فى جوهرها البحث عن إبرة فى كومة قش.

ويمكن التعرف على المستنسخ الصحيح بواسطة مجس الجين نفسه، ويتكون المجس من قطعة من الـ د.ن.أ مرقمة اشعاعيا، لها تسلسل مناظر لتسلسل الحمض الأمينى المعروف لقطعة البروتين، والطريقة بديلة، إذا صنع المنـتج البروتينـى للجـين فـى الخلايـا المستنسخة ، فيمكن الكشف عنه بواسطة جسم مضاد معين، أو بعمل اختبار للنشاط البيولوجى الحقيقى للبروتين.

فى الحالات التى يتوفر فيها تسلسل حمض أمينـــى جزئـــى لمنـــتج الجـــين المطلوب، فإنه يمكن إنشاء مجسات د.ن.أ مرقمة اشعاعياً،تحتوى من ١٥ إلى ٢٠نكليوتيدًا،بحيث يكون لها تسلسلات نكليوتيديـــة تنـــاظر تسلســـل الحمـــض الأمينى(شكل ٤-٣)، وسوف يكون هناك عدة تسلســـلات نكليوتيديـــة محتملـــة

متوقعة،لأن لمعظم الأحماض الأمينية أكثر من كودون واحد، وبناء عليه يجب أن تخلق عدة مجسات.



شكل ٤-٣ مخطط لاستنساخ جين بشرى، تتطلب إحدى طرق الاستنساخ أن يتم عزل كمية صغيرة من البروتين التى يشفر عنها الجين، وأن يحدد تسلسل الحمض الأميني الجزئي، من هذا التسلسل يمكن التنبوء بالتسلسل النكليوتيدى لقطعة الـ د.ن.أ المناظرة للجين، بعد ذلك يجرى تخليق قطعة الـ د.ن.أ بصورة إشعاعية وتستخدم كمجس للكشف عن المستنسخ البكتيرى فى مكتبة الجين البشرى،التى تحتوى على الجين نفسه، بمجرد التعرف على المستنسخ الصحيح، يمكن الحصول على الجين بكميات مناسبة لتحديد تسلسله النكليوتيدى الكامل،وبذلك يمكن تحديد تسلسل الحمض الأمينى الكامل للبروتين، ويمكن أيضاً وضع الجين فى"متجه تعبير" يسمح بصنع كميات كبيرة من البروتين فى إحدى الخلايا السهلة النمو ،مثل بكتير أو خميرة.

ويرتبط المجس المرقم إشعاعيا بأى جين له تسلسل د.ن.أ متمم، ويجب أن يشفر الجين المكتشف بهذه الصورة عن التسلسل البروتينى الذى تأسس عليه المجس، وفى ظروف تجريبية معينة، سيتعرف المجس المرتبط على الجين المرغوب من بين ملايين الجينات الموجودة فى بنك الاستنساخ، وقد استخدم الأسلوب مرات كثيرة لاستنساخ جينات بروتينات لا يتم عزلها إلا بكميات قليلة تكفى لتحديد تسلسل الحمض الأمينى الجزئى الأولى.

وعندما يكون لبروتين نشاطا بيولوجيا يسهل الكشف عنه،فإنه يمكن التعرف على الجين المناظر فى بنك استنساخ عن طريق الفرز للتعبير عن البروتين، ويتطلب هذا الأسلوب،أن تنتج قطعة الجين الغريب بروتينا وظيفيا، مثل إنزيم أو هرمون، فى الخلايا العائلة، ويجب أن تكون لأية خلية تصنع البروتين، مستنسخ الجين المطلوب. وقد استخدم فصل التعبير لاستنساخ الجين كثيراً ،حيث كانت للطريقة ميزة واضحة لعدم احتياجها لتنقية البروتين أولاً.

وتعتمد الطريقة الثالثة أيضاً على قدرة الجين المرغوب على إنتاج بروتينه،فى حين يتم فى هذه الطريقة الكشف عن وجود البروتين بواسطة جسم مضاد معين ، بدلاً عن اختبار نشاط بيولوجى، والجينات المشفرة عن بروتينيات يتوفر لها أجساما مضادة ملائمة، مرشحة لهذه الطريقة من طرق التعرف.

تعيين الصفات المميزة للجين واستغلاله

Gene characterization and manipulation

يعد التسلسل السريع للـــ د.ن.أ أسلوباً آخر من الأساليب الناجحـــة التـــى طورت مع تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم، كانت لطرق التحديد الســـريع هـــذه للتسلسلات النكليوتيدية للـــ د.ن.أ أهمية كبيرة فى تمييز الجينات المستنسخة، فقد جعلت عملية تسلسل البروتينات نفسها المضنية إلى حد ما، عملية مهجـــورة الاستخدام تماماً ، لأنه يمكن تحديد التسلسل النكليوتيدى كله لجين ما حالياً فـــى غضون أيام، ومن ثم يمكن استخدام تسلسل الجين للحصول على تسلسل الحمض الأمينى للبروتين المناظر.

وغالباً ما يرغب البـــاحثون فـــى تغييـــر تسلســـلات الأحمـــاض الأمينيـــة للبروتينات،إما بغرض استنباط علاقة مفصلة للتركيب لتقوم بالعمل أو لتعـــديل الوظائف الفسيولوجية للبروتينات بطـــرق معينـــة، وبمجـــرد أن يـــتم تخليـــق البروتينات فمن الصعب تغييرها بصورة مباشرة ، فى حين يمكن تغيير الجينات حالياً بأى طريقة مرغوبة ، وسوف يمثل التغير بأمانة فى البروتين الذى ينتجه الجين، ويمكن أن يصنع هذا البروتين المتغير إلى ما لا نهاية وبكميات كبيرة فى مستنسخات الخلية التى يوجد بها الجين المتغير.

هندسة الخلايا وراثياً لإنتاج البروتين

The genetic engineering of cells for protein production

إن إحـــدى الســـمات المميـــزة للشـــفرة الوراثيـــة genetic code وتخليـــق البروتين،هى احتفاظها تقريباً بكل صور الحياة المختلفة على وجه الأرض، هذه المشاركة فى استخدام الـــــ د.ن.أ كمادة للجينات وكشفرة متطابقـــة لاســـتقراء الجينات فى صورة بروتينات، تتيح استخدام خلايا أى كائن لإنتاج بروتينات من جينات مطعمة، وفى واقع الأمر ، أصبح حاليًا من الممارسات البسيطة نسبياً فى الهندسة الوراثية إنتاج البروتينات البشرية فى الخلايـــا البكتيريـــة أو النباتيـــة أوالحيوانية أن يستزرع جينا مستنسخاً ملائماً فى الخلايا.

وعلى سبيل المثال،فإن بروتين الإنترفيرون البشرى interferon، الذى يجرى اختباره ليكون مضادا للسرطان وعاملاً مضاداً للفيروس، كان لا يمكن الحصول عليه من قبل إلا باستخراجه من الخلايا البشرية، ولم تكن الكميـــات الصـــغيرة المستخرجة منه بهذه الطريقة تسمح للإنترفيرون بأن يقيم إكلينيكياً فى أعـــداد كبيرة من المرضى ، وعلاوة على ذلك، فلـــدى البشـــر العديـــد مـــن جينـــات الإنترفيرون،والمادة المعزولة من الخلايا البشـــرية هـــى خلـــيط معقـــد مـــن الإنترفيرونات المختلفة تركيبياً، ذلك الموقف الذى أضاف عبئًا على جهود تقييم كفايته الإكلينيكية، وبقدوم استنساخ الجين،أصبح من الممكن إنتاج الإنترفيـــرون النقى فى الخلايا البكتيرية بكميات كبيرة،من أى من الجينات البشرية المختلفة.

وعلى الرغم من أن الشفرة الوراثية والآلية التى تستخدمها الخلايـــا لصـــنع البروتينات شيئان عموميان، فإن الإشارات الحقيقية التى تحكم تعبير الجينات، تختلف من كائن عضوى لآخر، ونتيجة لذلك، فللحصول على تعبير مرتفع لجين

منقول ، فمن الضرورى دائماً أن يتم ربط تسلسلات الجين المشفرة عن البروتين بالتسلسلات الحاكمة فى الكائن العضوى الذى يجرى داخله صنع البروتين.

وقد فهمت بصورة جيدة إشارات تعبير الجين gene expressing وتخليق البروتين لـ أ.كولاى، ذلك البكتير المعروف الذى درس بإسهاب طوال عدة عقود ، ومما لا يثير الدهشة حينئذ أن يكون أ.كولاى من الكائنات العضوية الأكثر استخداماً فى إنتاج البروتينات المطعمة، ويجرى عادة إدخال الجينات الغريبة فى جزيء د.ن.أ حلقى صغير،يطلق عليه بلازميد، الذى تم هندسته ليحتوى على وظائف جينية تضمن وقايته فى الخلايا البكتيرية، ويتم إدخال الجين الغريب عن طريق شق البلازميد بواسطة إنزيم قيد وقطع،وبعد ذلك يستخدم إنزيم يعرف بإنزيم ليجاز لربط أطراف الجين بأطراف د.ن.أ البلازميد.

ويجرى هندسة التعبير عن طريق إدماج إشارات منظمة من خلية عائلة فى البلازميد مع الجين(شكل ٤-٤)، وفى معظم الحالات، تستخدم الإشارات التى درست بعناية،التى إما أن تكون مشتقة من أ.كولاى أو من جينات الفيروسات التى تصيب البكتير للحصول على تعبير الجينات الغريبة.

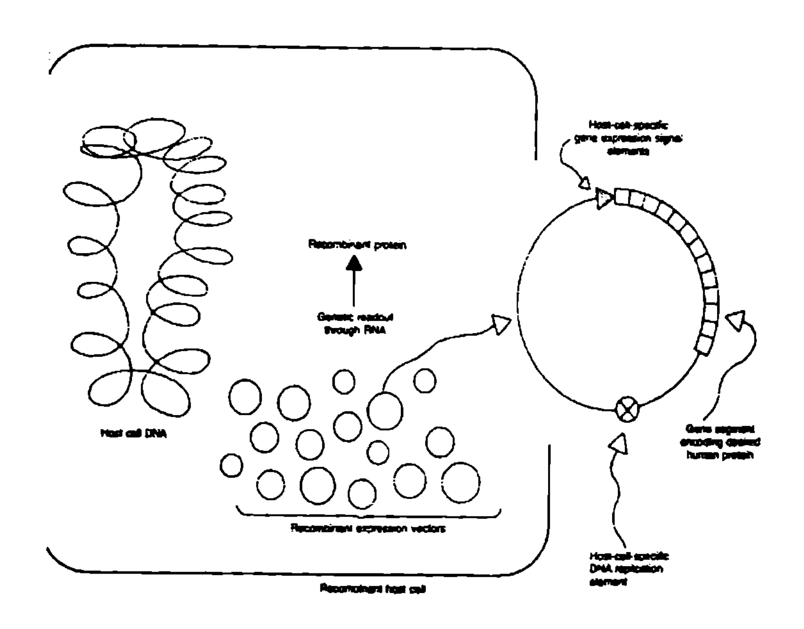
تعمل بعض البلازميدات المطعمة بصورة جيدة،لدرجة أنه عندما يجرى إدخالها فى أ.كولاى يصل عدد جيناته نحو ١٠٠٠جين، فإن البروتين الغريب الذى ينتجه البلازميد يصل إلى حوالى ٦٠%من مجموع البروتين المصنوع داخل الخلايا البكتيرية، وباستخدام هذه التكنولوجيا القوية،يمكن الحصول على أى بروتين،بأية كمية تقريباً ، طالما كان من الممكن استنساخ جينه، والبروتينات البشرية التى تصنع بواسطة تخمر مستنسخات أ.كولاى مطعمة مناسبة، قد وفق

على استخدامها الاكلينيكى فى البشر، وتشمل هذه المنتجات المطعمة، الأنسولين البشرى،الذى قام بصنعه Eli Lilly وزملاؤه فى إنديانا بوليس بولاية إنديانا، وهرمون النمو البشرى الذى قامت بإنتاجه شركة جينتك Genentech Inc. فى جنوب سان فرانسيسكو بولاية كاليفورنيا،والإنترفيرونات البشرية التى قام بصنعها هوفمان لاروش Hoffmann La Roche,Inc من نانلى بولاية نيوجرسى،ومؤسسة شيرينج بلف كورب.Schering-Plugh Corp. فى ماديسون بولاية نيوجرسى.

وخميرة الفطرية السكرية الجعوية Saccharomyces cervisiae ،هى فطر ذو خلية واحدة، له مميزات ممكنة معينة تتفوق على أ.كولاى فى إنتاج البروتينات البشرية، وتوجد بكتيريا أ.كولاى بصورة طبيعية فى أمعاء الإنسان،ويمكن أن تسبب مرضا فى ظروف معينة ، ونادراً ما تكون الخميرة كائناً يسبب المرض للبشر، وعلاوة على ذلك، فإنها تفرز بروتينات عديدة فى الوسط الذى تنمو فيه،الذى يعنى أنه يمكن جمع البروتينات دون الحاجة إلى فصلها عن البروتينات الخلوية للخميرة، وهناك ميزة أخرى لاستخدام خلايا الخميرة،هى قدرتها على إضافة سلاسل جانبية من السكر للبروتينات التى تصنعها، وتعبر هذه السلاسل الجانبية ذات السمات الشائعة فى البروتينات البشرية والكائنات الراقية الأخرى،وقد تكون ضرورية للأداء السليم للبروتينات، ومع ذلك، فالسلاسل الجانبية المنتجة فى الخميرة،لا تشبه تماماً السلاسل الجانبية الموجودة فى خلايا الكائنات الثديية.

ويجرى إنتاج العديد من البروتينات البشرية المهمة فى الخميرة، بيد أن مميزات هذا الكائن المتفوقة على أ.كولاى فى إنتاج البروتينات الدوائية،لاتزال

فى حاجة إلى إثبات، ومع ذلك،فقد تكون الخميرة والخلايا الفطرية الأخرى مثالية فى إنتاج كميات كبيرة من البروتينات الكبيرة،مثل الإنزيمات الصناعية،التى تتأثر بها اقتصايات الإنتاج.



شكل ٤-٤ إنتاج البروتينات المطعمة، يتم إدخال الجين المشفر عن البروتين المطلوب فى متجه تعبير(الذى يظهر مكبرا فى الجزء الأيمن من المخطط)، الذى يكون عادة إما بلازميدا أو فيروسا ، ويتيح متجه التعبير صنع المنتج الجينى فى الخلايا العائلة المرغوبة سواء كانت هذه الخلايا فى الأصل، بكتيرية،أوخميرة،أو خلايا ثديية أو نباتية، ويجب أن يحمل المتجه الإشارات الأساسية لنسخه فى الخلايا العائلة،ويحمل أيضا إشارات التحكم الجينى المطلوبة لنسخ د.ن.أ المتجه فى ر.ن.أ الرسول،والنقل اللاحق لـ ر.ن.أ الرسول داخل البروتين.

وغالبا ما يصعب تخليق البروتينات البشرية المهمة من الناحية البيولوجية فى أ.كولاى،التى لا تضيف سلاسل جانبية من السكر للبروتينات، وعلاوة على ذلك،فللعديد من البروتينات الثديية المهمة علاجياً تركيبات مطوية معقدة،والتى تعتبر ضرورية للنشاط البيولوجى للبروتينات وتدعمها وظائف متبادلة ذات طبيعة خاصة جداً.

وتشمل هذه البروتينات المعقدة منشط نسيج مولد البلازمين TPA، الذى قد يستفاد منه فى إذابة الجلطات الدموية، والمعامل VIII الذى يستخدم فى علاج مرضى الهيموفيليا، وبروتينات كهذه لا تصنع بالشكل الصحيح فى بكتيريا أ.كولاى، ولذا تصبح موادا خاملة، وقد طورت نظم الخلية الثديية التى تصنع كميات كبيرة من البروتينات النشطة المطعمة، التى غالبا ما تفرز فى الوسط المزرعى .

خطوات تقدمية فى فهم المرض
Advances in understanding disease

إن أعظم فائدة للتكنولوجيا الحيوية هى التعجيل الواضح الذى حدث فى اكتساب معرفة جيدة بالفسيولوجيا البشرية والمرض على المستوى الجزيئى (جدول ٤-١)، فبالإضافة إلى إبراز دور البروتينات العظيم، فإن الأبحاث تقدم معلومات جديدة عن الأوجه الوراثية للمرض، وبالتالى تؤدى إلى فهم أفضل للآليات الجزيئية التى تفسر سبب حدوث السرطان وأمراض معدية مثل الأيدز (مرض نقص المناعة المكتسبة)، ومهدت السبيل أيضا لطرق تشخيص، وربما معالجة الأمراض الوراثية.

جدول ٤-١ إسهامات التكنولوجيا الحيوية فى العلوم الأساسية

تعجـل الخطـوات التقدمية فى أساليب التكنولوجيا الحيوية اكتساب المعرفة الأساسية المتعلقة بالنظم الحية عن طريق:

١- الكشف عن شبكات التحكم الفسيولوجية الطبيعية.

٢- توضيح الأسباب الجزيئية للمرض.

٣- الكشف عن العوامل والأحداث التنظيمية الأساسية .

٤- تحديد الجزيئات المستهدفة والتفاعلات الجزيئية للتدخل العلاجى.

الاتصال بين الخلايا

Communication between cells

إحدى فئات البروتينات والببتيدات المهمة جداً، تلك الفئـة المسـتخدمة فـى الاتصال بين الخلايا، فالإشـارة الضـمنخلوية Intercellular signalling هـى إشارات أساسية فى التنسيق الملائم لوظائف الأنسجة المختلفة وأعضاء الجسـم، وغالباً ما يحدث هذا الاتصال بواسطة البروتينات المنظمة التى تفرزها إحـدى الخلايا لتؤثر على نشاط الخلية الأخرى، وعلى الرغم من التعرف على المئات من هذه البروتينات المنظمة، إلا أن الباحثين قد بدأوا منذ فتـرة وجيـزة فـى التعرف على شبكة التفاعلات المعقدة التى تتحكم فيها .

ويعزى هذا التقدم إلى حد كبير إلى أساليب استنساخ الجين، حيث أمكن للمرة الأولى إنتاج بروتينات منظمة، مثل الهرمونات، وعوامل النمو، والمسـتقبلات بكميات كبيرة تكفى لتحليل أنشطتها، ولاسـتخدامها كعوامـل علاجيـة عنـد الضرورة.

والإنترفيرونات من بين البروتينات الإشارية الضـمنخلوية الأولـى التـى اختبرت بأساليب التكنولوجيا الحيوية، وعلى الرغم من أن التقدم كـان يجـرى

على تنقية اثنين من أنواع الإنترفيرونات الأساسية ،إنترفيرونات ألفا وبيتا، من قبل أن تستنسخ جيناتهما،فقد أدت القدرة على استخدام الجينات المستنسخة لصنع البروتينات البشرية فى خلايا أ.كولاى إلى تعجيل هائل لأبحاث الإنترفيرون.

وعلى سبيل المثال،فقد أظهر الاستنساخ وجود مجموعة تتكون من حوالى ٢٠ جيناً مختلفاً،تشفر عن إنترفيرون ألفا البشرى، ويجرى حاليا صنع بعض من هذه البروتينات ،ويجرى تقييمها بيولوجياً وإكلينيكياً، فقد كانت الإنترفيرونات المطعمة التى صنعها هوفمان لا روش وشيرينج البروتينات المطعمة الأولى التى وافقت عليها هيئة الأغذية والدواء الأمريكية(FDA)، للاستخدام البشرى، والتى لم تكن تستبدل بروتيناً كان متوفراً بالفعل عن طريق التنقية من مصادر طبيعية. والدلالة المثيرة لتوفر الإنترفيرونات المطعمة،هى التقييم الإكلينيكى السريع والشامل لإمكانات البروتينات كعوامل مضادة للفيروس والسرطان،التى حدثت منذ اكتشاف الاستنساخ، وعلى الرغم من أن فعالية الإنترفيرون كعامل وحيد لعلاج السرطان،كانت قاصرة إلى حد بعيد على الأورام الخبيثة النادرة نسبيا،فلم يكن للتقييم أن يتم إلا بتوفر البروتينات المطعمة، والآن وقد أصبح الإنترفيرون متوفرا حاليا لباحث الأورام الأكلينيكى، فإنه يمكن دراسة إمكاناته للاستخدام مع العوامل العلاجية الأخرى.

وكان للإنجاز النمطى للاستنساخ، والتعبير، والتنقية لبروتينات التنظيم الحيوى النادرة بصورة طبيعية تأثيراً قوياً على دراسة بيولوجيا الخلية، وعادة ما كان يضطر إلى القيام بدراسات بيولوجيا الخلية السابقة بخلطات غير نقية من البروتينات النشطة حيوياً، وكانت الدراسات فى غاية الصعوبة ويصعب تكرارها.

وقد نتج عن التطورات التكنولوجية الحديثة اكتشاف العديد من البروتينات المنظمة الجديدة،وسهّلت بعض التعقيدات التى كانت تحدث فى الماضى من العمل بجزيئات بيولوجية غير متميزة ، وظهر التقدم جلياً فى علم المناعةimmunology، يعتمد الأداء الطبيعى لجهاز المناعة على مجموعة معقدة من التفاعلات بين خلية وخلية،التى تتخللها ،إما بروتينات مفروزة، مثل اللمفوكيناتlymphokines والسيتوكيناتcytokines، أو بروتينات سطح الخلية ،مثل مستقبل الخلية الغلافية T-cell receptor.

أحد هذه السيتوكيناتcytokine هو إنترليوكين-٢، وهناك سيتوكيناً آخر هو إنترليوكين-١،وهو جزيء نشط تنتجه كريات وحيدة monocytes وأنواع أخرى من الخلايا المناعية،ويلعب دوراً حاسماً فى تنشيط بعض الاستجابات المناعية، وقد ساور الشك الباحثون فى الماضى فى أن يكون للإنترليوكين-١ العديد من الأنشطة الإضافية، التى لا يقتصر جميعها على الجهاز المناعى، وتشمل هذه الأنشطة إحداث الحمى، وبعض الأنشطة التى يمكن أن تساعد على الشفاء الطبيعى للجروح، فى حين يمكنها أن تساهم أيضاً فى تطوير الالتهاب المزمنchronic inflammation، وبعض الحالات، مثل التهاب المفاصل arthritis.

ولما كان الباحثون غير قادرين على تنقية كميات معقولة من المواد التى تحدث التأثيرات العديدة، فلم يستطيعوا مقارنة تلك المواد بصورة مباشرة، والاستنساخ الحديث لجينين متباينين من الإنترليوكين-١ غير أنهما مرتبطان ببعضهما،قد حل المشكلة من خلال السماح بإنتاج البروتينات المطعمة النقية،

وقد أوضحت الدراسات التى أجريت على هذين البروتينين ،أن الإنترليوكينين-١ يعرضان سلسلة كبيرة من الأنشطة البيولوجية المختلفة.

وعلاوة على ذلك، فمقارنة إنترليوكين-١ المطعم بكاكيتين cachetin (مرض متعلق باعتلال الصحة)،وهو منتج آخر وحيد الخلية ،الذى أصبح متوفراً فى صورة مطعمة،كشف على أن أنشطة هذين البروتينين متداخلتان،بينما يظهران اختلافات واضحة، وبالاضافة إلى ذلك، فبمقارنة تركيب الكاكيتين ونشاطه بتركيب ونشاط عامل النقرس الورميtumour necrosis factor ،الذى استنسخه جينه أيضا، أظهر أن هذين البروتينين متطابقان. ولما كان عامل النقرس الورمى(TNF) وهو بروتين موجود بصورة طبيعية، قد بشّر بآمال لاستخدامه كعامل مضاد للورم ضد العديد من السرطانات،فقد بدأت التجارب الإكلينيكية على ذلك العامل لمرضى الأورام قبل أن يثبت تطابقه مع الكاكيتين.

وقد أدى هذا الاكتشاف إلى تعميق فهم دور الجزيء بدرجة كبيرة فى الفسيولوجيا البشرية،لكنه قلل من قيمته أيضاً كعامل مضاد للورم، وعلى الرغم من أن الكاكيتين على ما يبدو،ينتج كجزء من جهود الجسم لمكافحة السرطان،إلا أنه يسبب نقص تغذية شديد واعتلالا يسمى بالدنف cachexia الذى يظهر غالباً على مرضى السرطان، وغالبا مايظهر عامل النقرس الورمى-الكاكيتين بأنه الوسيط الرئيسى الموجود بصورة كامنة فى الصدمة التسممية الباطنية القاتلة،التى تحدث للمرضى بعد الإصابة ببعض الفيروسات الميكروبية الممرضة.

السـرطـان
Cancer

السرطان هو مركب من الأمراض لاتزال غير مفهومة بالكامل برغم جهود البحث التى استمرت لسنوات طويلة، فالخلايا السرطانية هى خلايا طبيعية تغيرت بطرق جعلتها تتكاثر بصورة غير صحيحة، فهى تظهر أنها تؤدى وظائف النمو والتميز الخلوية الطبيعية ، لكنها تقوم بذلك فى الوقت أو المكان غير المناسب أو بدرجة غير مناسبة، فقد تخلصت من سيطرة الجسم عليها، والبحث فى الماضى عن أسباب المرض قد تدرج فى عدة مسارات مختلفة، لدرجة أنه حتى وقت قريب، قد سار فى تشعبات مختلفة ونادراً ما توصلت إلى شيء .

تهتم إحدى الطرق بتولد السرطان الكيميائيchemical carcinogenesis ، وهى دراسة العوامل المولدة للسرطان التى تسبب الأورام فى الحيوانات، وقد حددت هذه الطريقة أصناف المسرطنات الكميائية، واقترحت أن العوامل تسبب السرطان عن طريق إحداث طفرات جينية، وعلاوة على ذلك،أوضحت الدراسات أن السرطان عملية متعددة الخطوات ، تتضمن خطوات مستقلة،تبدأ بخطوة استهلالية،والتى يحتمل أن تكون تغير جينى دائم،وتستمر نحو خطوات نشطة تحول الخلية المتغيرة إلى حالة من الورم الخبيث malignant.

والفحص الدقيق عن المسار الطبيعى للسرطانات البشرية والأورام التجريبية التى استزرعت فى الحيوانات قد أظهر بصورة مشابهة أن تطور السرطان هو عملية متعددة المراحل ، و عادة ما تقتصر الأورام فى المرحلة المبكرة على نسيج واحد، وفى الغالب فإن هذه الأورام تنتشر فى المراحل التالية من المرض

فى أنسجة أخرى، ومع ذلك ،فلم تأت الدراسات التى أجريت علـــى بيولوجيـــا الورم بالكثير من المعلومات عن الآليات المتضمنة بدء السرطان وانتشاره.

وتقدم الأبحاث التى أجريت على التركيب الوراثى للسرطان دليلاً آخر على صلة الجينات بتطور السرطان، فالعديد من الأشكال السرطانية، على الرغم منها أنها عادة أنواع نادرة مثل، ورم ويلمز Wilm's tumour ، وورم جرثومة شـــبكية العين retinoblastoma ، إلا أنها تحدث بشكل متكرر فى عـــائلات معينـــة،وهى حالة تقدم دلالة قوية عن الاستعداد الوراثى لهذه النوعية من الأمراض، وعلاوة على ذلك، فهناك علاقة ارتباط قوية بين حدوث هـــذه الأمـــراض وســـرطانات أخرى وتشوهات كرموسومية معينة.

وكان البحث عن الفيروسات السرطانية أحد الموضوعات الرئيسة لأبحـــاث السرطان طوال الخمسة عشر عاما الماضية، وأظهر هـــذا البحـــث أن بعـــض الفيروسات تساهم بشكل مباشر أو غير مباشر فى تطور السرطانات البشـــرية، وتشمل هذه الفيروسات على T-cell lymphotrophic virus I البشرى،الذى يسبب مرض سرطان الدم leukaemias والأورام اللمفية lymphomas وبعض ســـلالات فيروس ورم الحلمة البشري papilloma virus ،الذى كان مرتبطـــاً بالســـرطان العنقي cervical cancer؛وفيروس التهاب الكبد ب hepatitis B virus الذى يعتبـــر المشارك البارز فى تطوير سرطان الكبد،وبصفة خاصة فى الصين ودول جنوب شرق آسيا الأخرى،وفيروس Epstein-Barr ،الذى يسبب ورماً لمفياً منتشراً فـــى أفريقيا، وكان مرتبطا أيضا بسرطان أنفيبلعومي nasopharyngeal cancer.

والأكثر من ذلك، فإن البحث الفيروسى، وخصوصاً على عدد من الفيروسات التى وجد أنها تسبب السرطانات فى حيوانات التجارب،قد أسهم بدرجة كبيرة فى

تفهم التغيرات الكيمياحيوية التى تحول الخلايا إلى حالة للورم الخبيث، وعــزّت الدراسات إلى وجود جينات معينة تحملها فيروســات ورميــة حيوانية،تسـبب التحول إلى الخباثة الورميةmaliganancy، ترتبط هذه الجينات الورمية المســماة بمولدات الأورامoncogenes ارتباطا مباشرا بالجينات الخلوية الطبيعية المسماة بـــمولدات الأورام البدائيةproto-oncogenes،التى تقوم بدور النمو والتميز.

وعلى مايبدو، فإنه أثناء دورة العدوى، تلــتقط الفيروســات هــذه الجينــات الخلوية،التى أصبحت نتيجة لذلك نشطة بصورة غيرملائمة، وبالتالى تكشف عن إمكاناتها المولدة للسرطان، وقد تــوج البحــث عــن الفيروسـات الســرطانية بالملاحظة المهمة،وهى أن خلايــا بعــض الســرطانات الموجــودة بصــورة طبيعية،والتى تشمل على الأورام البشرية،التى لا تصــاحبها أيــة فيروســات معروفة،تحتوى على مولدات سرطانية نشطة ذات قدرة تحويلية.

وساعد اكتشاف المولدات السرطانية على التوفيق بين نتائج الطرق المختلفة عن أبحاث السرطان التى ذكرناها، فوجود مجموعة محدودة من الجينات، والتى توجد فى جميع كرموسوماتنا، وقادرة على أن تؤدى إلى التحول المولد للسرطان عندما تنشط بصورة غير ملائمة،يعطى أسساً جزيئية منطقية لفهم السرطان.

تتضمن أحد خطوط البحــث التــى أشــارت إلــى أهميــة نشــاط مولــد الــورمoncogene فــى الســرطانات البشــرية، دراســات التشــوهات الكروموسوميةchromosomal abnormalities ،التى توجد فى العديد من الخلايــا السرطانية، وعلى سبيل المثال،فورم بركت اللمفيBurkitt's lymphoma، وهو الورم الخبيث الذى ينمو بصورة هجومية فى الخلايا ب الموجودة فى الجهــاز

المناعى تصاحبه ترتيبات كروموسومية معادة معينة، ينتقل فيها مولد السرطان الفطريmyc oncogene الموجود بداخل الخلايا السرطانية إلى موقع كرموسومى جديد، ونتيجة لذلك، يبدو أن الجين يهـــرب مـــن التنظـــيم الخلـــوى الطبيعـــى لتعبيره،ولذا يسبب التحول السرطانى للخلايا.

وقد أظهر وجود أورام سرطانية معينة بواسطة مولدات السرطان الكيميائيـــة علاقة ارتباط قوية مع طفرات معينة، تقوم بتحويل مولد السرطانى البدائى إلى مولد سرطان، وقد وجدت نفس الطفرات فى خلايا بعض السرطانات البشـــرية، بالإضافة إلى ذلك، ظهر أن التحول الخبيث لبعض الخلايا المستزرعة،يتضـــمن تنشيط مسرطنين مستقلين ، ولذلك يعمل كنموذج لاختبار الانتشـــار المتعـــدد المراحل للسرطان فى البشر،فانتشار بعض الأورام السرطانية البشرية بصـــورة نمو انبثائى وشديد الفتك ،كان يرتبط أيضاً بنشاط مولد السرطان.

ولم يتم التوصل حتى الآن إلى فهم كامل عن دور مولدات الســـرطان فـــى تطوير السرطان البشرى ، فهناك عوامل أخرى،بالإضافة إلـــى نشـــاط مولـــد السرطان، قد تساهم فى إحداث المرض، وعلى سبيل المثال، توجد أدلة على أن فقد أو خمود نشاط المواد المعوقة لنمو الخلية، قد تكون أيضاً مشتملة فى مبحث أسباب السرطان، ومع ذلك، يساعد اكتشاف مولدات السرطان على تقديم القاعدة الأساسية فى اختبار الآليات الأساسية لتحول المولد الســـرطانى، وقـــد عجلـــت تكنولوجيا الـــ د .ن.أ المطعم والطرق المنهجية المتصلة بالموضـــوع بدرجـــة كبيرة هذه الأبحاث على الأقل،وربما تجعلها تتحقق على أرض الواقع.

أعراض نقص المناعة المكتسبة(الأيدز)

Acquired immune deficiency syndrome

ربما تكون الحالة الأكثر وضوحا لقوة وفائدة التكنولوجيا الحيوية فى مجـــال الصحة،تلك المعركة الدائرة حالياً ضد أعراض نقص المناعـــة(الأيـــدز)، تلـــك الحالة التى اكتشفت لأول مرة فى الولايات المتحدة فى عـــام ١٩٨١،واتســـمت بوجود عدوى غير عادية مباغتة،أو صورة نادرة سابقة من ســـرطان يـــدعى بكابوزى ساركوما Kaposi's sarcoma أو كلاهما، وتم التعرف علـــى المشـــكلة الأساسية بأنها هبوط شديد فى الجهاز المناعى، ينشأ عن نقص كامل تقريبا لأحد أنواع الخلايا اللمفيةT، وهى الخلايا المساعدة المطلوبة لبدء واستمرار العديد من الاستجابات المناعية.

وبحلول عام ١٩٨٣،كانت هناك دلالة كافية لوجود فيروس مكتشف حـــديثاً، يصيب ويفتك بالخلايا المساعدة ويسبب الأيدز، والطرق الرئيسة لنقل الفيروس تأتى عن طريق الاتصال الجنسى،ومنتجات الدم، والإبر الملوثة وقد ينتقل هـــذا الفيروس أيضاً من الأم لوليدها ،إما فى الرحم أو أثناء الولادة.

وتزايدت أعداد كل من المصابين بالأيدز والمصـــابين بـــالفيروس المعـــدى بصورة تضاعفية ، ولولا التغيير فى الزيادة التى نتجت عن التغيـــرات التـــى اعترت أساليب حياة الأفراد المصابين،لاستمر الوباء فى الزيادة بكامـــل قوتـــه، وبنهاية عام ١٩٨٦،كانت هناك أكثر من ٢٩٠٠٠حالة إصابة بالإيدز، و ســـجل أكثر من ١٦٠٠٠ حالة وفاة فى الولايات المتحدة وحدها،وكان هناك مـــا يزيـــد على مليون شخص يحملون فيروس المرض، ولا يزال عدد الأفـــراد الـــذين

سيتطور معهم المرض فى النهاية غير معروفا، وتفيد الإحصائيات حالياً بأن ٣٠% من هؤلاء الأشخاص الحاملين للفيروس سيطورون المرض، بالإضافة إلى ذلك، ينتشر الإيدز فى بعض مناطق وسط أفريقيا.

وتبذل حالياً جهود مضنية من أجل فهم الإيدز والفيروس الذى يسببه، فقد تم فى خلال عام واحد من اكتشاف الفيروس تحديد التسلسل النكليوتيدى الكامل لمجموعة العوامل الوراثية الفيروسية،وهو إنجاز آخر لتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم،ويجرى حالياً بذل الجهود لتشخيص وظيفة كل جين من جيناته، وفهم طبيعة عمل الفيروس ،مما يعد عاملاً حاسماً فى مقاومة تأثيراته فى الأفراد الذين أصيبوا بالفعل،ولتطوير لقاحات لمنع مزيد من العدوى.

ولما كان الفيروس يشكل تهديداً كبيراً على أمان مورد الدم،فقد طورت الاختبارات بسرعة،للتمكن من استبعاد الدم الذى يتبرع به الأشخاص الذين تعرضوا للمرض، وكانت الاختبارات الأولى غير متقنة،ولكن بعد سنوات ثلاث من تحديد الفيروس،تم تطوير اختبارات متقنة يعتمد عليها للكشف عن الفيروس،وتقييم مدى انتشار الإيدز فى الأشخاص المصابين.

وهناك جهود تبذل حالياً لتطوير لقاحات للحماية من العدوى بفيروس الأيدز،وتصنع اللقاحات عادة من فيروسات ميتة وموهنة،غير أن فيروس الأيدز من الخطورة لدرجة أنه لا تتبع طريقة التحصين بالفيروس الميت تماماً ، أحد المداخل للقاحات التى يجرى استكشافها للحماية من الأيدز والأمراض الأخرى ،هى التحصين ببروتينات الفيروس الممرض، ويمكن صنع البروتينات بكميات وفيرة بواسطة كائنات مجهرية مهندسة وراثياً،والتى يزود بها جينات فيروسية، وقد استخدمت هذه الطريقة كل من معامل أبحاث مرك شارب ودوم فى راهواى

بولاية نيوجرسى ، ومعامل سميث كلاين والمعامل الفرنسية فى فلادلفيا ، بولاية بنسلفانيا ، للوقاية من العدوى بفيروس التهاب الكبد الوبائى ب .

وتضمن مدخل آخر لصنع اللقاحات على التحصين بفيروس الجدرى البقرى Viccinia Virus ، الذى تم هندسته وراثيًا لنقل وتعبير الموروثات المضادة من فيروس آخر ، فيروس الأيدز على سبيل المثال ، وفيروس الجدرى البقرى الذى استخدم بالفعل على نطاق واسع فى التحصين ضد الجدرى Smallpox ، سوف يعمل فى هذه الحالة كوسيلة لإدخال الموروثات المضادة من فيروس آخر أكثر خطورة ، يستطيع إحداث استجابة مناعية وقائية .

وأخيرًا ، فقد تمكن أساليب الـ د .ن . أ المطعم الباحثين من إبطال مفعول فيروس الإيدز وراثيًا ، عن طريق إزالة أو تغيير جيناته ، بحيث يمكنه أن يصيب شخصًا ويولد مناعة وقائية ضد الصورة الفيروسية للفيروس دون أن يسبب المرض نفسه ومن السابق لأوانه إذا حدث ذلك ، معرفة أى من هذه المداخل التى ستنجح مع فيروس الإيدز ، لكنه من الواضح أنه لا يوجد أحد منهم يتوقع نجاحه بدون الأساليب القوية للتكنولوجيا الحيوية .

ويعتبر إيجاد علاجات موثرة لمرضى الإيدز والمصابين بفيروس الإيدز ، الذين لم يقعوا تحت وطأة الإصابة الكاملة بالمرض تحديًا آخر ، فأى عقار يمكن أن يبطل العدوى الفيروسية ، يمكن أن يمنع كل من انتشار المرض فى الأشخاص المصابين وفى غير المصابين .

وفى الماضى ، كان هناك نجاح محدود فى إيجاد العلاجات المؤثرة المضادة للفيروس ، ومع ذلك ، تقدم التكنولوجيا الجديدة الوسيلة للوصول إلى تحديد سريع للأنشطة المشفرة عن الفيروس الضرورية لنمو فيروس الإيدز ، ولذلك تعتبر

هدافًا للعلاج المضاد للفيروس ، وفيروس الإيدز صغير جدًا ولايحتوى إلا على جينات قليلة ، والتى قد تجعل من السهل إيجاد عقارات مؤثرة له .

والمعرفة المتزايدة لوظائف فيروس الإيدز وبروتيناته ، تحمل فى طياتهـا وعودًا مبشرة بإمكانية التعرف على العوامل التى تتدخل معه فى النهاية ، ولما كانت الوظائف البروتينية فريدة بالنسبة للفيروس ، فلن يؤثر التدخل فى أنشطتها بدرجة سيئة على المريض الذى يجرى علاجه ، إن النجاح فى مقاومة فيروس الإيدز ، عندما يأتى لن يكون سريعًا .

جبهة جديدة فى العقاقير الدوائية

A new frontier in pharmaceuticals

ليست التكنولوجيا الحيوية مجرد أداة أتاحت تعجيلاً هـائلاً فـى اكتسـاب معرفة بالأمراض البشرية ، لكنها أيضًا وسيلة لإنتاج البروتينات ومشـتقاتها ، التى تلعب أدوارًا مهمة فى النظم الفسيولوجية المصابة ، وقد فتح جمـع ثمـار الفهم الأساسى للمرض ، وتوفر البروتينـات المنظمة الفعالة جبهة جديدة مثيرة فى البحث الدوائى والطب البشرى .

المرحلة الأولي :

استخدام البروتينات الطبيعية والببتيدات كعقاقير دوائية

Stage I : Natural proteins and peptides as pharmaceuticals

يبدأ حاليًا الاستخدام الدوائى للعصور المطعمة من البروتينـــات الطبيعيـــة البشرية فى الوفاء بما وعدت به التكنولوجيا الحيوية فى مجال الصـــحة ، وأول هذه البروتينات ، هو الأنسولين البشرى المطعم وهرمون النمو البشرى ، اللذان وافقت عليهما هيئة الأغذية والدواء الأمريكية للاستخدام البشرى ، ولا يفى هذان العقاران ببعض الاحتياجات المكتشفة حديثًا ، لكنهما يحلان محـــل البروتينـــات الطبيعية .

وحتى ذلك الوقـــت الذى تـــم فيه استنســـــاخ الجيـــــنات مـــن أجـــــل الهرمـــونات ، فقد كان يأتى المصدر الوحيد للأنسولين عن طريق عزله مـــن الماشية والخنازير ، ولايمكن الحصـــول على هرمـــون النمـــو البشــــرى إلا مـــن الغـــدد النخـــامية لجـــثث الموتى ، ويستخدم كلا الهرمونين فى تصحيح العيوب : يستخدم الأنسولين لمرضى البول السكرى ، الذين فشل بنكرياسهم فى صنع هذا الهرمون ، ويستخدم هرمون النمو البشرى لعلاج القزمية ، التى تظهر نتيجة فشل الغدة النخامية pituitary gland فى إفراز هذا الهرمون

ويوفـــر الأنســـولين البشرى المطعـــم الذى طـــــوره إيــــــلى ليلـــــى وزمـــلاؤه مورد كاف من هذا الهـــرمون ، بصـــرف النظـــر عـــن مـــــورد البنكرياس الحيوانى ، وسوف يســــتفيد منـــه أيضًـــــا مرضـــــى البـــــول السكـــرى diabetes ، الذين أصبحت لديـــهم حســـاسية ضـــد الأنســـــولينات الحـــــيوانيــــــة ، وســـوف يتيـــح توافـــر هرمـــون النـــــمو البـــشرى

المطعم،الذى أنتجته شركة جينتك أيضاً العلاج المثالى للأطفال الذين يعانون من القزامة النخاميةpituitary dwarfism بسبب فشل الغدة النخامية،أوقصـــر القامـــة نتيجة لأسباب أخرى، وقد كان الهرمون متوفراً من قبل بكميات قليلة،ولذا كانت تكاليفه مرتفعة، بالإضافة إلى ذلك،يجرى تقييم هرمون النمـــو البشـــرى كـــى يستخدم فى الحماية من نقص البروتين،والاعتلال الذى يحدث نتيجـــة المـــرض الحاد وحالات الجروح.

وقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية FDAعلى هرمون النمو المطعـــم فى وقت مبكر،عندما تم سحب المادة الطبيعية البشرية من الاستخدام الإكلينيكى فى الولايات المتحدة،حيث كان يرتبط تعاطيه بمرضCreutzfeldt-Jacob ،وهو اضطراب فيروسى بطيء المفعول، ينتج عنه تدهور دائم للجهاز العصبى، وقد أعلت هذه النتيجة المأساوية لاستخدام منتج طبيعى مـــن شـــأن ميـــزة الأمـــان الأساسية الموجودة فى المنتجات المطعمة.

وأثناء تطوير هرمون النمو المطعم،استطاع البحث الذى ساعدت عليه تقنيات جديدة التعرف على عامل منظم آخر من سلسلة هرمون النمو، ووجود عامـــل إفراز،الذى يكون مطلوبا من أجل استخراج هرمون النمو من الغدة النخامية،قد تم التفكير فيه لبعض الوقت، ومن خلال الطرق المتقدمة لتنقية وتسلسل وتخليق البروتينات،استطاعت مجموعات روجر جويلمن ومجموعة وايلى فال فى معهد سالك فى لا جولابكاليفورنيا، أن تتوصل أخيراً فى عام ١٩٨٣ إلى عزل عامل إفراز هرمون النمو(GRF)،الذى أنتج بمقادير ضئيلة من تحت السرير البصرى فى الدماغ المتوسط.

والعيب الكيميائى الحيوى الحقيقى وراء معظم حالات القزمية الناتجة عن قصور الغدة النخامية،هو غياب عامل إفراز هرمون النمو، والمرضى المصابون بغياب هذا العامل،يمكن أن تنتج أجسامهم هرمون النمو بصورة طبيعية فى الغدة النخامية لكنه لا يفرز، وحالياً وبعد أن تم التعرف على عامل الإفراز،وأصبح من السهل إنتاجه، فسوف يحل بشكل نهائى محل هرمون النمو كعلاج طبيعى ومفضل لمعظم عيوب النمو.

وسوف تستفيد الأمراض الأخرى التى نجمت عن قصور بروتينات معيبة من الاستخدام العلاجى للبروتينات المطعمة أيضاً، وهناك مثال مهم،ألا وهو الهيموفيلياhaemophilia، وهو العيب الوراثى لعدم تجلط الدم، الذى يسببه نقص بروتين يعرف باسم معاملVIII. ولوقف نزيف الدم،يجرى علاج مرضى الهيموفيليا بمعاملVIII طبيعى،ويتم تحضيره من الدم البشرى، ونتيجة لذلك، أصبح معظم مرضى الهيموفيليا مصابين بفيروس الإيدز،الذى كان موجوداً فى مستحضرات معامل VIII الملوثة، وعلى الرغم من أن الطرق الحديثة لإخماد نشاط الفيروس قد حسنت كثيراً من أمان المادة الطبيعية،إلا أن توفر معاملVIII المطعم،سوف يهدىء من خوف مرضى الهيموفيليا من الإصابة بالإيدز،الذى يعقد مرضهم بطريقة مأساوية.

وقد تم التعرف على العيوب الجزيئية الكامنة وراء العديد من الأمراض الوراثية، و تشمل بعض من هذه الأمراض مثل Gaucher's و Tay-Sachs و Fabry's قصور فى إنزيمات نتجت عن تراكم غير طبيعى للمواد التى كانت ستهدم لولا غياب الإنزيمات، وقد يستفيد الأشخاص المصابون ببعض الأمراض

يضاً من الحقن بصور مطعمة من الانزيمات، هـــذه الأمـــراض والأمـــراض لوراثية الأخرى قد تستفيد أيضاً من العلاج الجينى الذى يتم فيه إجراء هندســـة وراثية لخلايا بعض المرضى،لإنتاج الإنزيم المفقود(انظـــر الفصـــل الخـــامس عشر).

واستخدام الصور المطعمة من بروتينات التنظيم الحيوى الطبيعـــى لزيـــادة الاستجابات الفسيولوجية الطبيعية للأمراض، تعتبر فئة ثانيـــة مـــن تطبيقـــات المرحلة الأولى، فقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية بصفة مبدئية علـــى إنترفيرون الكرية البيضاء المطعم،لاستخدامه ضـــد أمـــراض الأورام الخبيثـــة النادرة،التى تسمى بـــــليوكيميا الخلية الشـــعريةhairy cell leukaemia ،بينمـــا يعتبر العامل مؤثراً أيضاً فى الأورام الأخرى،التى تشمل مـــرض Kaposi's sarcoma المرتبط بالإيدز ،وســـرطان الخليـــة الكلويـــةrenal cell carcinoma والورم الأسود الخبيثmalignant melanoma ، ويعطـــى الإنترفيـــرون معـــدل استجابة تصل حوالى ٩٠% للمرضى المصابين بسرطان الدم ، بينمـــا كانـــت العلاجات السابقة غير مؤثرة إلى حد كبير.

لا يعرف على وجه التحديد كيف يعمل الإنترفيرون على انحســـار الأورام، فعامل(الإنترفيرون) يعمل على كبح انتشار بعض مجموعات الخلية الورمية فى المزرعة،ويعجل من نشاط الخلايا الطبيعية المهاجمة،التى تعتبـــر جـــزء مـــن دفاعات الجهاز المناعى ضد الأورام، وكان الفحص الدقيق للإنترفيرونات مـــن أجل العلاج السرطانى إلى حد كبير عملية تقديرية، فالدراسات التى أجريت على الفئران أو الحيوانات الأخرى الحاملة للورم،لم تترجم بصورة جيدة إلى علاجات للمرضى من البشر.

ولا يعتبر إنترفيرون الكرية البيضاءLeucocyte interferon، البروتين المطعم الوحيد،الذى يجرى تقييمه لعلاج السرطان، فالتجارب التى أجريت على العوامل الأخرى،إما بمفردها أو بالاشتراك مع صور أخرى من العلاج، قوبلت بالنجاح وبحماس كبير من باحثى الأورالإكلينيكيين،على الرغم من أن آليات تأثير العوامل،لم تكن مفهومة بشكل كامل.

وطوال مسيرة البحث الدوائى،تم تجريب مواد فعالة،ووجد أنها على درجة كبيرة من الفاعلية لعلاج الأمراض،قبل أن تفهم علاقة تأثيرها على الآلية الأساسية لهذه الأمراض، ومثلما كان يحدث تمامًا مع الفحصوات الدقيقة للمزيد من الدوائيات التقليدية، فيجب ألا تقتصر أبحاث السرطان الإكلنيكية بواسطة الإنترفيرونات والسيتوكينات المطعمة فقط على التعرف على العلاجات المفيدة،بل يجب أن تساعد أيضًا على توضيح بيولوجيا ومناعة السرطان.

وإنترليوكين-٢ من بين العوامل الإضافية الأخرى التى يجرى فحصها،وهو بروتين تنتجه خلاياT فى الجهاز المناعى،و هو منشط مهم لاستجابات خلاياT، وقد أدى استنساخ جين إنترليوكين-٢ البشرى إلى توفر البروتين المطعم لدراسته معملياً، ولدراسته فى الحيوانات الصغيرة، وعلاوة على ذلك، فبسبب فعاليته كمحفز مناعى،يجرى اختباره إكلينيكيا أيضا لعلاج الإيدز والسرطان، ويعد انترليوكين-٢ المطعم بأن يكون علاجاً لسرطانات معينة لم تفلح معها أشكال العلاج الأخرى.

أحد أنواع العلاجات الذى يقوم بتطويره ستيفن روزنبرج وزملاؤه فى معهد السرطان القومى فى بتسدا،بولاية مريلاند،كان له بشير نجاح خاص فى الدراسات الأولية ضد الأورام الصلبة المتقدمة التى قاومت صور العلاج

لأخرى، وفى طريقة العلاج هذه ، تؤخذ من مريض خلايا دم بيضاء، وتنشـــط بتعريضها لإنترليوكين-٢ فى المزرعة، ثم يعاد حقنها فى المريض مع مزيد من البروتين. وقد انحسرت نسبة الأورام حوالى ٤٥% فى ٥٥ شخصاً تلقوا هــذا العلاج، وظهر أن خمسة أشخاص تعافوا من الورم، ومــع ذلــك ،فالتــأثيرات الجانبية للعلاج بالإنترليوكين-٢ قد تكون شديدة ــ فقد مات عــدد قليــل مــن المرضى نتيجة لذلك ــ وطريقة العلاج معقدة ومكلفة ، وإذا دعمــت النتــائج الأولية للطريقة بفحوصات أخرى،فسوف تقود الحاجة إلى العلاج إلى إجراءات أبسط وأقل تكلفة، مع التقليل من التأثيرات الجانبية الشديدة.

والبروتين الطبيعى الآخر،الذى يعد بنتــائج مبشــرة جــداً فــى الأبحــاث الإكلينيكية،هو منشط نسيج مولد البلازمين(TPA)،وهو انــزيم بشــرى يــذيب جلطات الدم من خلال تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين، والبلازمين،هو إنزيم آخر يعمل على هدم بروتين الفبرين،الذى يعتبر عنصراً أساسياً فى جلطات الدم، ويستخدم حالياً انزيما يوركيناز وستربتوكيناز إكلينيكيا فى إذابة التجلط ، وهمــا ينشطان أيضاً البلازمين،ولكن يقومان بذلك بطريقة ما بحيث يــدمران كلاهمــا جلطات الفبرين غير الذائبة ومولــد الفبــرين الــذائب فــى الدم،الــذى ينــتج الفبرين،والذى يكون مطلوباً للحفاظ على سلامة نظام التجلط.

وينشط الــــ TPA البلازمين غالباً عند جلطات الفبرين، ولذلك فإنــه ذو تخصصية شديدة، وله ميزة إضافية فى كونــه يســهل إعطائــه بــالحقن فــى الأوردة،بينما يفضل أن يعطى اليوركيناز والإستربتوكيناز عن طريق قســطرة مباشرة إلى موقع التجلط، وإذا قدمت التجارب الإكلينيكية براهين أخرى علــى فعالية الـــ TPA، فقد يؤدى العلاج به فى يوم ما إلى تغيير جذرى حــاد فــى

علاج مرضى السكتة القلبية، وقد يكون الإنزيم الأول فى سلسلة الإنزيمات المستخدمة فى زيادة آليات التخلص من جلطات الدم.

تقترب المرحلة الأولى من البحث الموجهة نحو الاكتشاف والتشخيص الكيميائى الحيوى والتقييم البيولوجى للبروتينات البشرية الطبيعية للأغراض الطبية، بأية حال من نهايتها، وبالإضافة إلى البروتينات القليلة التى تم تشخيصها جيداً حتى الآن، فلا يزال هناك مخزون من البروتينات المنظمة الحيوية تحتاج إلى فهمها ، وهى الإنزيمات المنظمة الحساسة ،والمستقبلات التى قد تعمل كمرشحات(لهذا الدور) أو أهداف لعلم المداواة.

وعلى الرغم من أنه قد يكون للبروتينات البشرية المطعمة التأثيرات الدوائية المرغوبة، إلا أنها ليس من الضرورى أن تناسب بشكل مثالى لاستخدامها كعقاقير، وغالباً ما تصنع البروتينات فى الجسم للموقع الذى تستخدم فيه،ولها عادة أنصاف عمر قصيرة جداً، والحاجة إلى إعطاء البروتينات عن طريق الحقن(تتحطم البروتينات فى القناة الهضمية،ولذا لاتعطى بطريق الفم)،وفترات بقائها القصيرة، خصيصتان لا تحبذان استخدامها كأدوية.

ويقدم عامل إفراز هرمون النمو،مثالاً لهذه الحالة، فإنه يخلق فى منطقة(ماتحت السرير البصرى)hypothalamus ، وينقل لبضعة سنتيمترات فى الغدة النخاميةpituitary gland حيث يبدأ مفعوله، وبالرغم من أن عامل إفراز هرمون النموGRF،يدمر بسرعة فى الدم،فإن تركيزه فى الغدة النخامية يعتبر كافياً لتنظيم النمو والتوزان النتروجينى للجسم،عن طريق السيطرة على إفراز هرمون النمو، ويعمل عامل إفراز هرمون النمو بصورة طبيعية أيضاً منسجماً مع عوامل التحكم السالبة،مثل هرمون سوماتوستاتينsomatostatin للحفاظ على

إفراز هرمون النمو بمستويات صحيحة، ولا يتم الحصول على التوازن الــدقيق للعوامل المضادة عند اعطاء هرمون النمو المطعم بطريق الحقن، لكنه يتحقــق تماماً من خلال العلاج بعامل إفراز هرمون النمو.

وهناك طريقتان مختلفتان يجرى استخدامهما لتحسين العلاج بعامــل إفــراز هرمون النمو والبروتينات المطعمة الأخرى، وهاتان الطريقتــان همــا تعــديل المعامل نفسه لجعله أقل عرضه للتحلل، وتطوير نظم جديدة لإدخال العوامــل، وسوف يؤدى إثبات فاعلية العلاج البروتينى للمزيد من الأمراض إلى الابتكــار التكنولوجى المطلوب للوصول إلى نظم توصيل، تستطيع أن تقدم بروتينا فــى المكان والزمان المطلوبين فيه.

والإفراز البطيء للمادة التى تم تغليفها بغلاف من البولمر أو فى تركيبــات غشائية تعرف بالليبوسومات،تعد إحدى هذه الإمكانات، والإمكانية الأخرى،هى تطوير الأجهزة التى يتحكم فيها الكمبيوتر لتوصيل الدواء، وسيكون فى الإمكان فى النهاية التغلب على مشاكل أنصاف العمر القصــيرة،والحاجة إلــى إعطــاء الدواء بطريق الحقن.

المرحلة الثانية :

استخدام بروتينات وببتيدات معدلة طبيعية كعقاقير دوائية

StageII:

Modified natural proteins and peptides as pharmaceuticals

يتضمن المسار التقليدى لاكتشاف الدواء،استخدام النماذج التجريبية للتعـرف على العوامل،سواء كانت طبيعية أو تخليقية،ويكون لها تأثيرات مرغوبة، وثبت أن معظم الجزيئات التى تم التعرف عليها من خلال هذا المسـار،غير ملائمـة للاستخدام كدواء،إما لأنها ليست فعالة بدرجة كافية،أو موجودة فـى الكائنـات الحية،أو لأن بها مواد سمية، أو من الصعب تخليقها.

إلا أن هذه الجزيئات تعمل كأدلة مهمة للكيميائى التخليقى، فى أن تركيباتهـا قد تفترض متطلبات تركيبية معينة،تضفى نشاطاً مرغوبـاً للجـزيء، ويمكـن استخدام المعلومات فى إنشاء أنواع مختلفة من الجزيء الأصلى، التـى ربمـا عندما تختبر ، تحدد فيما بعد العلاقة بين التركيـب والنشـاط الـدوائى، وقـد استخدمت هذه الطريقة مرات عديدة لترتقى بمركب أولى له مظهر نشاط دوائى مرغوب إلى عقار آخر فعال.

وتقدم التكنولوجيا الحيوية مساراً موازياً متميزاً للمسار الأكثر تقليداً لتصميم العقار، فقد انتجت أصناف جديدة من الـدلائل- البروتينـات النشـطة دوائيًـا والموجودة بصفة طبيعية،وقد أضافت التكنولوجيات أيضاً، نوعـاً جديـداً مـن كيمياء الجزيئات الكبيرة التى يمكن أن تعدل بداخلها الجينات ، بحيـث يمكنهـا إنتاج بروتينات متغيرة، تعتبر أكثر ملاءمة للاستخدام الدوائى عـن الجزيئـات الأصلية(جدول ٤-٢).

جدول ٤-٢ . مراحل التطور التكنولوجى الحيوى

المرحلة الأولى	صنع بروتينات طبيعية مثل: الإنترفيرونات الإنترليوكينات منشط نسيج مولد البلازمين الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ
المرحلة الثانية	صنع بروتينات طبيعية معدلة : الجيل الثانى والثالث من منشط نسيج مولد البلازمين الأجسام المضادة المهجنة من الإنسان-الفأر
المرحلة الثالثة	إنشاء محاكيات تخليقية من البروتينات الطبيعية

والمثال الرائع على هذه المرحلة الثانية من توجيه تعديل البروتين،هو الجهد المبذول لتطوير جزيئات TPA الجيل الثانى، وجزيئات الإنزيمات المنظمة بصورة دقيقة مثل TPA، تنقسم إلى مناطق وظيفية تسمى "الحقول"،بحيث يمكن الحصول على التنظيم الفعلى من خلال ارتباط عوامل تحكم أخرى، وعلى سبيل المثال،فللـ TPA حقل موقع نشط، يحفز تحويل مولد البلازمين إلى بلازمين،والذى يدمر حينئذ جلطات الفبرين ، ويضفى حقل آخر للـ TPA على الإنزيم تخصصه لتنشيط البلازمين عند جلطات الفبرين، ولا يزال يوجد حقل آخر للـ TPA ،وهو موقع ارتباط مادة(أو مواد) كابحة طبيعية.

ولما كانت فترة نصف العمر البيولوجية للـ TPA قصيرة جداً، فإن جرعات وفيرة من البروتين تكون مطلوبة للحصول على إذابة جلطة مؤثرة، وعلاوة على ذلك، يتطلب التركيب المعقد للجزيء أن ينتج فى خلايا حيوانية، وفى خلايا ميكروبية،مثل خلايا أ.كولاى، وهى الاختيار الطبيعى لإنتاج

البروتينات المطعمة،يجرى صنع الـــــTPA بصورة صحيحة بالنســبة إلـــى تسلسل حمضه الأميني الأولى، فى حين تتكون الجسور المتبادلـــة للدياســـلفايد بطريقة غير سليمة،ولاينطوى البروتين بصورة سليمة.

ولما كان الــــTPA المصنوع فى الخلايا الحيوانية مكلفاً جداً، فمن الأفضل تقليل المقادير التى يجب أن تعطى، عن طريق زيادة ثبات البــروتين وتقليــل حساسيته للكابح الطبيعى، وسيكون صورة من الــــTPA ذات فتــرة نشــاط أطول مفيدة أيضاً فى منع تكون جلطات ثانوية،والتى تعتبر شيئاً طبيعيـــاً بعــد علاج حاد بالعامل. ويجرى بذل جهد كبير فى إعادة نمذجة جزيء TPA علــى طول هذه المسارات للوصول إلى مستحضر دوائى أكثر ملاءمة.

والببتيدات peptideأصغر من البروتينات،ويمكن صنعها بواســطة الكيميــاء التخليقية،فضلاً عن الحصول عليها من تعبير الجينات المطعمة، وكانت الببتيدات منذ وقت طويل مستهدفة للتعديل،والعديــد مــن العوامــل الدوائيــة التجاريــة الموجودة، هى صور من الببتيدات الطبيعية التى تم تغييرها للوصول إلى فتــرة تأثير سريعة.

ولا يقتصر تخليق الببتيد على استخدام حمض أمينى طبيعى،كما فــى حالــة إنتاج البروتينات المطعمة من الخلايا الحية، والعديد من التعديلات ممكنة والتى تجعل من الببتيدات ثابتة بقدر كاف لكى تعطى عن طريق الفم، ويمكن محاكاة مراكز النشاط لبعض البروتينات الكبيرة المنظمـــة حيويـــاً بواســـطة ببتيــدات تخليقية،وهو التقدم الذى يؤدى إلى المرحلة الثالثة مــن تطبيقــات التكنولوجيــا الحيوية فى مجال علم العقاقير.

لمرحلة الثالثة :

ستخدام محاكيات من البروتينات المنظمة الحيوية الطبيعية كعقاقير دوائية

:Stage III

Mimetics of natural bioregulatory proteins as pharmaceuticals

تبذل جهود ملموسة فى الوقت الراهن لتطوير القدرة على تقليــد النشـــاط لبيولوجى للبروتينات بواسطة جزئيات عضوية ، تكون خالية من روابط الببتيد غير المستقرة ، ويمكن تناولها عن طريق الفم ، ويتأسس هذا البحث على إدراك أن البروتينات تتفاعل مع بعضها البعض ومع جزئيات أخرى خــلال أجــزاء محددة بدرجة شديدة ومحدودة المسافة على أسطح البروتينات ، ويعطــى بقيــة تركيب البروتين الدعامة الكلية للحقول العديدة عن طريق ربطها معًا فى تكامل وظيفى متماسك .

ويتطلب تطوير محاكيات بروتينية مناسبة ، تحديــد التركيبــات الفراغيــة المفــصلة للبروتيــنات النشطة حيويًا ، بحيث يمكن فهم تفاعلاتهــا بالتفصــيل الدقيق ، وعلى التوازى ، وإسهامًا فى هذا الفهم ، توجد دراسات متغيرات عديدة للبروتين التى تغيرت تفــاعلاتها وأنشطتها البيولوجية ، وبجمــع نتــائج هــذه الأبحاث ، يمكن تكوين تصور واضح عن السمات التركيبية المهمة للتفــاعلات الوظيفية لبروتين .

وخـــلال تطوير تكنولوجيا الــ د.ن.أ المطعم ، كان هناك تقدم ملحوظ فى تكنولوجيات تحديد التركيبات الفراغية لجزيئات البروتينات الكبيرة، ومن أبــرز هــذه التكنولوجيات ، أوجه التقدم التى حدثت فى الجانب النظرى وفى تطــوير الآلات لتحديد تركيب البروتين بواسطة دراسات البلوريات بالأشعة الســينية ، وعن طريق استخدام مصادر الإشعاع الجديدة، فإن الكواشف المعقدة التى عجلت

بشكل هائل الحصول على البيانات وإمكانات أجهزة الكمبيوتر وبرامجه،جعل كل هذا من الممكن الحصول على تركيب فراغى لبروتين نموذجى منظم حيوياً فى غضون سنة واحدة.

والقيد الأساسى فى طرق دراسة البلوريات بالأشعة السينية البلورية X-ray crystallographic methods أبقى على الحاجة إلى إعداد بلورات بروتينية بجودة كافية من أجل التحليل، والتى كانت لا تزال مجرد فن عن أن تكون علماً قائماً، ولم تقدم التكنولوجيا الحديثة دعماً كبيراً لحل هذه المشكلة.

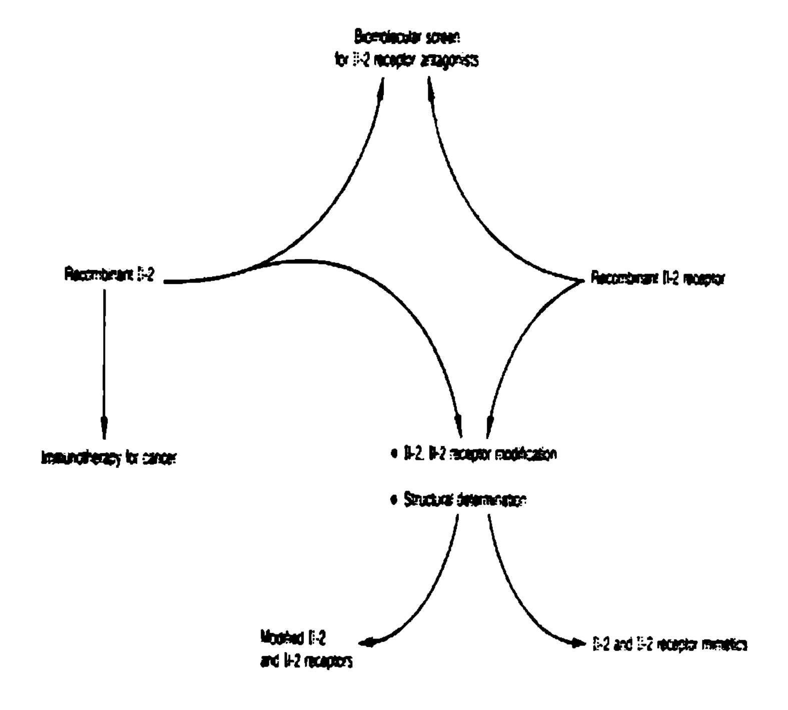
ومطيافية الرنين المغنطيسى النووى شديد المجال High-field nuclear magnetic spectroscopy،التى تتيح لعالم بأن يحدد تركيبات الجزيئات فى المحلول، هى أسلوب ثان فى مرحلة تقدم، وتقتصر هذه التكنولوجيا حاليا على جزيئات أصغر من معظم البروتينات النشطة حيوياً، لكنها تتطور مع تطور المزيد من الأجهزة القوية.

وأخيراً،فإن طرق الكمبيوتر المستخدمة للتنبؤ بالتركيبات الفراغية للبروتينات،إما من تسلسلات أحماضها الأمينية، أو من تركيبات معروفة لجزيئات شبيهة بها،آخذة فى التطور حيث أصبحت تتوفر أجهزة كمبيوتر قوية، ويستخدم هذا المدخل أيضاً الذى يلتقى مع التكنولوجيا الحيوية وتكنولوجيا الكمبيوتر وجهاً لوجه أساليب الصور الجزيئية الحديثة التى تتيح للعلماء رؤية جزيئات كبيرة فراغية على شاشة التليفزيون،لتعديل التركيب ولنمذجة التفاعلات بين الجزيئات، وسيكون هذا الأسلوب عظيم النفع ،لأنه يمكنه عرض التركيبات الفراغية للبروتينات المطعمة.

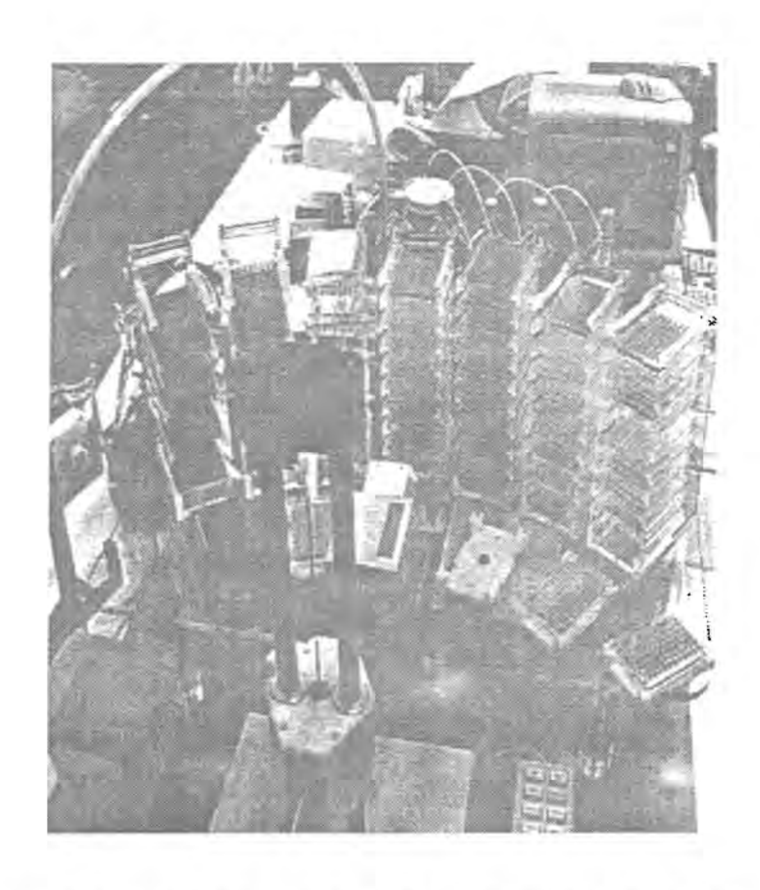
أدوات جديدة للاكتشاف الصيدلى
New tools for pharmaceutical discovery

على الرغم من أن هذا الفصل قد تركز على التطبيقات العلاجيـــة المباشـــرة للبروتينات المطعمة ومشتقاتها ومحاكياتها،فقد يوفر الاستخدام غيـــر المباشـــر للأشكال المطعمة من البروتينات الطبيعية أيضاً فرص لاكتشاف عوامل صيدلية جديدة(شكل ٤-٥)، وعلى سبيل المثال، فإن كل من إنترليوكين-١ وانترليوكين-٢، الذى يحفز كلاهما الاستجابات المناعية الطبيعية بدرجة كبيرةجداً، يحـــدثان تأثيرهما بواسطة التفاعل مع بروتينات متقبلة شديدة التخصص توجد على أسطح الخلايا المستهدفة، وتبطل العوامل التى توقف نشاط هذه التفاعلات الاستجابات المناعية، وقد تكون مفيدة علاجياً فى منع رفض استزراع العضـــو أو عـــلاج حالات ،مثل الالتهاب الجلدى الذئبى النظـــامي systemic lupus erythematosus ،والتهاب المفاصل الروماتزمي rheumatoid arthritis، الذى يكون فيهما الجهاز المناعى مفرط النشاط.

وهناك مدخل جديد للتعرف على العوامل المضادة لهذا الإنترليوكين،يستخدم صورا مطعمة من الإنترليوكينات ومتقبلاتها فـــى اختبـــارات منتقـــاة وشـــديدة الحساسية،للكشف عن العوامل التى توقف تفاعلاتها، ولما كانـــت الاختبـــارات تجرى بواسطة الكمبيوتر وأتوماتية التشغيل،فإنها تسمح باختبار أعداد ضـــخمة من العوامل المختارة بشكل عشوائى (شكل ٤-٦)، ويمكن فحـــص المركبـــات العضوية المخلقة،أو خلطات المواد المعقدة الموجودة فى وسائط نمو الكائنـــات المجهرية،من أجل النشاط العوامل المضادة للإنترليوكين بواسطة طرق جديدة.



شكل ٤-٥ . طرق استخدام إنترليوكين-٢ ،ومتقبل إنترليوكين-٢ المطعم، إنترليوكين-٢(II-٢) المطعم يجـــرى اســـتخدامه بصـــورة مباشرة فى العلاج التجريبى المناعى للسرطان، وهناك جهود تبذل أيضا للحصول على فهم أفضل للعلاقـــة بـــين تركيبـــات البروتينـــات وأنشطتها، مع فكرة إنتاج كل من صور البروتينات الطبيعية المعدلة، والمركبات التخليقية التى تحاكى تأثيراتها. وبهذه الطريقة،فقد يكون من الممكن تجهيز عوامل دوائية جديدة التى تعتبر أكثر فاعلية، أو لها سلسلة خصائص مختلفة عن العوامل الأصلية.
وقد يمكن استخدام الجزئيات المطعمة أيضا بصورة غير مباشرة كأساس لاختبار من أجل التعرف على العقـــاقير التـــى توقـــف ارتبـــاط إنترليوكين-٣ بمتقبله ولذلك قد تكون مفيدة فى إبطال الاستجابات المناعية فى المرضى ، الذين يجرى لهم نقل أعضاء والذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية .



شكل٤-٦ .الفحص الأتوماتى للعقاقير التى تعيق ارتباط إنترليوكين-١ وإنترليوكين-٢ بمتقبلاتهما، والجهاز معد من أجل فحص نشاط ٤٠٠ عينة مختلفة، مرتين ، فى ثلاث اختبارات آنية ، والاختبارات من أجل التدخل في الارتباط بين إنترليوكين-١ وانترليوكين-٢ ، واختبارات الجلوبين المناعى مع متقبلاتها، ويظهر الروبوط الذى يقوم بالعمليات فى واجهة الصورة ويمتد ذراعه للخلف إلى أعمدة الألواح، ويظهر الكمبيوتر الذى ينظم سير العمل فى خلفية الصورة.

ويحتوى العمود الثالث من اليمين على الألواح والعينات الجارى تحليلهاويحتوى العمود الأول والثانى والرابع من اليمين على ألواح بها مواد الاختبار، ويوجد بكل طبق ٩٦ عيناتحمل العينات أو مواد الاختبار، وتحمل يد الروبوط ٩٦ من الأطراف الأنبوبية الجاهزة،التى تلتقطها من الأطباق فى اليسار،وتستخدم لسحب المادة من العيون فى طبق العينة وتضعها فى أطباق لكل من الاختبارات الثلاثة.

والمركبات التى يوجد لها نشاط، يمكن إن لم تستخدم بطريقة مباشرة إخضاعها لتعديلات كيميائية نظامية لإنتاج عقاقير شديدة التخصص تناسب الاستخدام الآدمى، ولما كان من غير المحتمل أن تكون الجزيئات النشطة

بروتينات،ونتيجة لذلك تكون ذات تعقد تركيبى طيع ،فإن هذا المـــدخل جميعـــه يتناسب مع الإجراءات الثابتة فى الكيمياء الطبية.

تكمن روعة طرق الفصل الجديدة فى قدرتها على عمـــل اختيـــار منطقـــى للعناصر التى تستخدم كأساس للاختبارات المستخدمة، وقبل أن توجد تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعم،كان فصل هذا النوع غير ممكن ،إما لأن الآلية الأساســـية للأمراض لم تكن مفهومة ،أو أنه لم يكن الحصول على الجزئيـــات العضـــوية المعينة المستخدمة فى الآلية بكميات وفيرة، وبإسهام التكنولوجيا الحيوية فى كلا المجالين،أصبح من الممكن حالياً استنباط إجراءات أكثر منطقية لفحص العقاقير الجديدة.

الخلاصـــة

بدأت التكنولوجيا الحيوية تؤثر بشكل قوى على الصحة البشرية، وقد تركــز هذا الفصل على سمة محددة نسبيا:تأثير التكنولوجيا الحيويــة علــى اكتشــاف العوامل العلاجية الجديدة، وقد ناقشنا أيضاً، الزيادة السريعة فى اكتساب المعرفة المتعلقة ببيولوجيا الحياة، ولا يمكن حصر التأثير الإيجابى لهذه المعرفة المتزايدة التى تركزت على تحسين الصحة ، وعلى الرغم من أنه من الممكن التنبؤ بنوع العلاجات التى تستمد من تطبيقات التكنولوجيات الجديدة المبنية علــى مســتوى الفهم الحالى، فإنه يصعب التكهن التنبؤ بما سوف تؤديه المعرفة فى تغيير الدواء فى المستقبل البعيد.

يبقى هناك شيء واحد مؤكد،وهو أن التكنولوجيا الحيوية تقود التغيــر فــى مجال الطب والصحة البشرية،فإن هذا التغير يجرى بخطوات سريعة جداً عمــا كان يحدث فى الماضى. ولذا،يمكن القول بأن التكنولوجيا الحيوية،فتحت جبهــة جديدة فى مجال الصحة.

الفصل الخامس:

الإنتـــاج الميكــروبى للمـــواد الكيميــائية الحيــوية

The microbial production of biochemicals

ظلت الكائنات المجهرية لفترة طويلة من الزمن الدعائم الأساســية لإنتـــاج المواد الكيميائية،نظراً لأحجامها، وطرق معيشتها، وتعدد استعمالاتها، وتؤلــف الخلايا الميكروبية أنواعاً عديدة من المركبات، تتراوح ما بين سكريات بســيطة نسبياً،وأحماض أمينية، إلى مضادات حيوية وأصباغ أكثر تعقيداً، وإلى بروتينات ، وسكريات عدادية غاية فى التعقيد .

وبنفس الدرجة تتعدد الأنشطة البيولوجية للمنتجات الميكروبية، فهـــى تـــوفر أنواعاً عديدة من العقاقير، تشمل المضادات الحيوية**antibiotics**،التـــى أحـــدثت تغيرات جذرية فى علاج الأمراض المعدية**infectious diseases** والعوامل التى تعيــق نمــو الأورام وتســتخدم فـــى العــلاج الكيميـــائى للســرطان **cancer chemotherapy** والعوامل المضـــادة للالتهابـــات لعـــلاج التهـــاب المفاصـــل والأمراض المتصلة بها ، والأدوية التى تخفض مـــن ارتفـــاع ضـــغط الـــدم ؛ والمهدئات والأدوية الأخرى التى تؤثر على الجهاز العصبى، وتوفر الميكروبات أيضاً العديد من الإنزيمات المستخدمة فـــى الغـــذاء ،والصـــناعات الكيميائيـــة والدوائية، ومع ذلك فإن هذه المواد الكيميائية،ليست جميعها بذات أهمية تجارية، إلا أنه يمكن تحسين إنتاجها فى بعض الحالات إذا ظهرت لها أهمية تجارية.

يوضح جدول٥-١ تنوع المنتجات الميكروبية، ويبين أنه يمكن أن تصـــنف ،إما تبعا لمميزاتها الكيميائية أو الوظيفية،على الرغم مـــن أن التصـــنيفين قـــد

يتداخلان، وعلى سبيل المثال، فللعديد من الأملاح العضوية نكهات تجعلها مفيدة فى صناعة الأغذية،أو فى صناعة مستحضرات التجميل، وجميـــع الإنزيمـــات عبارة عن بروتينات.

جدول٥-١ المواد التى تصنعها الكائنات المجهرية

أصناف كيمائية	أصناف وظيفية
أشباه القلويات	مضادات حيوية
أحماض أمينية	نكهات
مواد كربوهيدراتية	عقاقير بخلاف المضادات الحيوية
استرات	إنزيمات
ليبيدات	مثبطات إنزيمية
أحماض نووية	مكسبات النكهة
أحماض عضوية وكحوليات	معجلات النكهة
	ببتيدات
	هرمونات
	بروتينات
	مبيدات الآفات
	أصباغ
	خافضات التوتر
	فيتامينات

ولما كان إنتاج المواد الكيميائية عن طريق الكائنـــات المجهريـــة ، يســـتغل المعلومات الوراثية التى تمتلكها وتعبر عنها هذه الخلايـــا الحيـــة،فإن مجـــيء الهندسة الوراثية الحديثة قدم فرصـــاً كبيـــرة للتطـــوير التجـــارى للمنتجـــات الميكروبية، والقدرة على تغيير التركيب الوراثي **genetic composition** لكـــائن

مجهرى ،إما عن طريق تعديل جيناته أو عن طريق إدخال جينات غريبة،سيكون له تأثير كبير على إنتاج المواد الكيميائية من الكائنات المجهرية.

الإنزيمات : مواد حفازة للتخليق الحيوى ولتحويل المواد العضوية إلى مواد أخرى

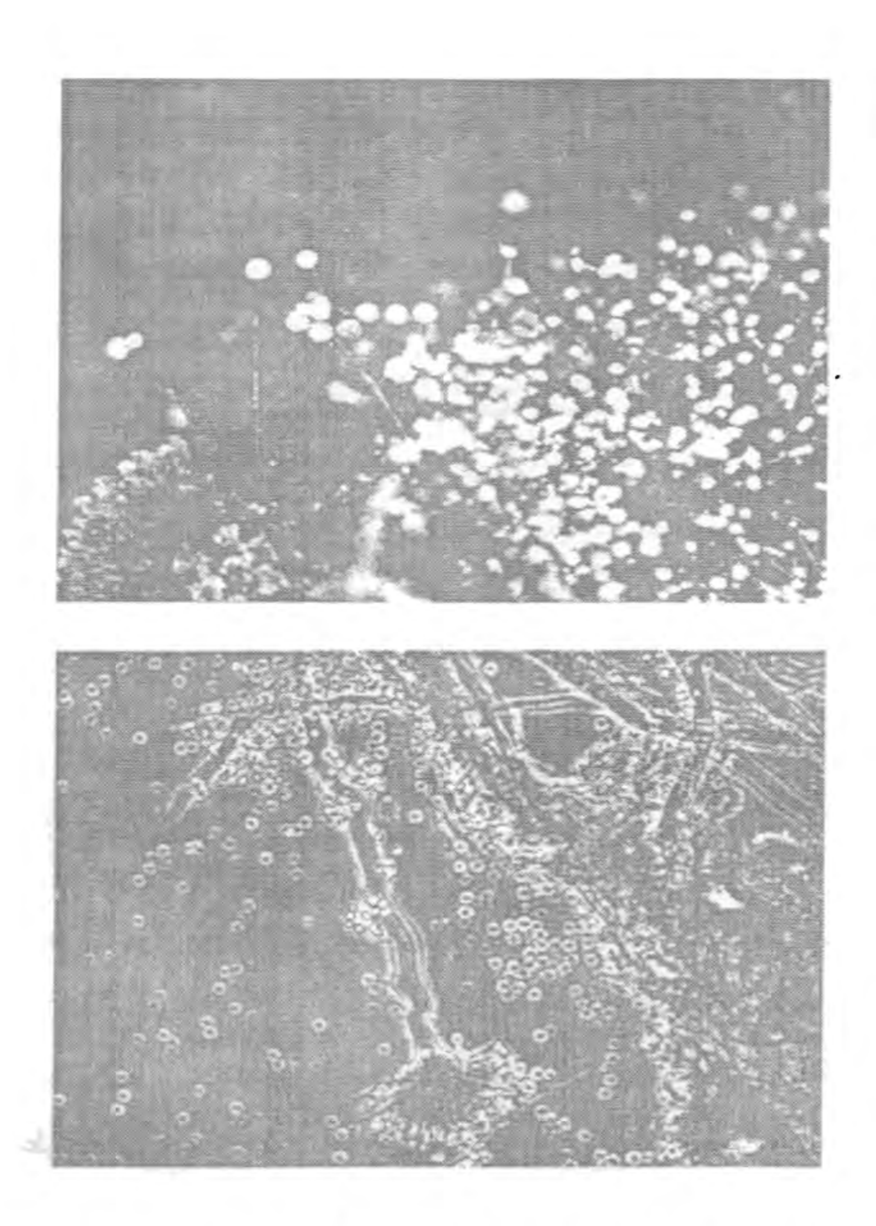
Enzymes: catalysts for biosynthesis and degradation

الإنزيمات هى المواد الحفازة التى تقوم بكل التفاعلات التخليقية والهدمية للكائنات الحية، وعلى الرغم من أنه يمكن الحصول على الإنزيمات من الحيوانات والنباتات وكذلك الكائنات المجهرية ، إلا أن الإنزيمات المستخرجة من المصادر الميكروبية تعتبر بصفة عامة الأكثر ملاءمة للتطبيقات التجارية(شكل ٥-١)، هناك سبب واحد لهذا،هو أن المنتجات الميكروبية يمكن أن تنتج بكميات كبيرة دون قيود يفرضها الموقع الجغرافى أو أحد فصول السنة،كالإنزيمات المشتقة من أصل نباتى،على سبيل المثال، بالإضافة إلى ذلك، تنمو الكائنات المجهرية بمعدلات سريعة، وتكاليف إنتاجها منخفضة نسبيا.

ومما لا يثير الدهشة، نظراً لتنوع التخليقات التى يمكن أن تقوم بها الكائنات المجهرية ، فنجد أن الطبيعة قد حبتها بمخزون هائل من الإنزيمات التى تقوم بسلسلة كبيرة من التفاعلات، ويقدر عدد الإنزيمات الموجودة فى الطبيعة بحوالى ٢٥٠٠٠إنزيماً، ومع ذلك،فلا يزال معظم هذا العدد الضخم من الإنزيمات غير مستغل ، وقد تم عزل وتمييز حوالى ٢٠٠٠ من هذه الإنزيمات فقط ، ولا يستغل منها تجاريا سوى أعداد قليلة. ومع ذلك، فإن الكائنات المجهرية توفر الإنزيمات التى تؤثر على كل الجزيئات البيولوجية الرئيسة

(جدول ٥-٢)، وللعديد من هذه الإنزيمات تطبيقـات تجاريـة فـى صـناعة الأغذية(انظر أيضا الفصل الثانى)، وكانت مبيعات الإنزيمات فى السوق العالمى عام ١٩٨٥ تزيد على ٥٠٠مليون دولار أمريكى.

ويوفر حفز الإنزيمات،عدداً من المميزات التى تفوق طرق الحفز الكيميائيـة التقليدية،فالإنزيمات لها قوة حفزية عالية إذ تزيد من معدل التفاعلات الكيميائية بنسب تتراوح ما بين ٩١٠ إلى١٢١٠، وعلاوة على ذلك،فهى تعمل فى ظروف معتدلة من درجات الحرارة، والأس الهيدروجينى، والضغط، وتظهر تخصصـاً شديداً **high specificity** للمواد التى تؤثر عليها ، وغالبًا ما تستطيع الإنزيمات التمييز بين الجزيئات وثيقة الصلة ببعضها، وأخيرا،وعلى الرغم من أن معظـم الإنزيمات تعمل فى المحاليل المائية،إلا أن البعض منها يمكنه القيام بالأنشـطة الحفزية فى المذيبات العضوية.



شكل ٥-١ صورة مصغرة لرشاشية Aspergillus. عفن من جنس الرشاشيات يعطى عدة منتجات تشمل العديد من الإنزيمات التي تستخدم في تصنيع الأغذية و مواد كيميائية مثل أحماض الليمون والجلوميك، ويستخدم العفن أيضاً في إنتاج مواد غذائية شرقية مخمرة مثل الساكي، والشويو، والميسو.

جدول (٥-٢) الانتاج الميكروبى للإنزيمات بواسطة التخمير .

Enzymes	Substrates	Microorganisms
Alpha-amylase	Starch	*Bacillus amyloliquifaciens*
		Bacillus licheniformis
Beta-amylase	Starch	*Bacillus polymyxa*
amyloglucosidase	Dextrins	*Aspergillus niger*
(glucoamylase)		*Rhizopus niveus*
Cellulases	Cellulose	*Phanerochaete chrysosporium*
		Trichoderma reesei
Glucose isomerase	Glucose	*Actinoplanes missouriensis*
		Arthrobacter sp.
		Bacillus coagulans
		Streptomyces olivochromogenes
Glucose-1-oxidase	Glucose	*Aspergillus niger*
Pyranose-2-oxidase	Glucose	*Polyporus obtusus*
Alpha-glucosidase	Maltose	*Aspergillus niger*
		Bacillus amyloliquefaciens
		Saccharomyces cerevisiae
Lipases	Lipids	*Aspergillus niger*
		Candida cylindracae
		Geotrichum candidum
		Rhizopus arrhizus
Pectinesterase	Pectin	*Aspergillus niger*
		Aspergillus oryzae
Proteinase, alkaline serine	Protein	*Aspergillus oryzae*
		Bacillus licheniformis
Proteinase, acid (pepsin-like)	Protein	*Aspergillus oryzae*
		Aspergillus saitoi
Proteinase, acid (rennin-like)	Protein	*Endothia parasitica*
		Mucor miehei
		Mucor pusillus
Proteinase, neutral	Protein	*Bacillus stearothermophilus*
Pullulanase	Amylopectin	*Aerobacter aerogenes*
		Bacillus cereus var. *mycoides*

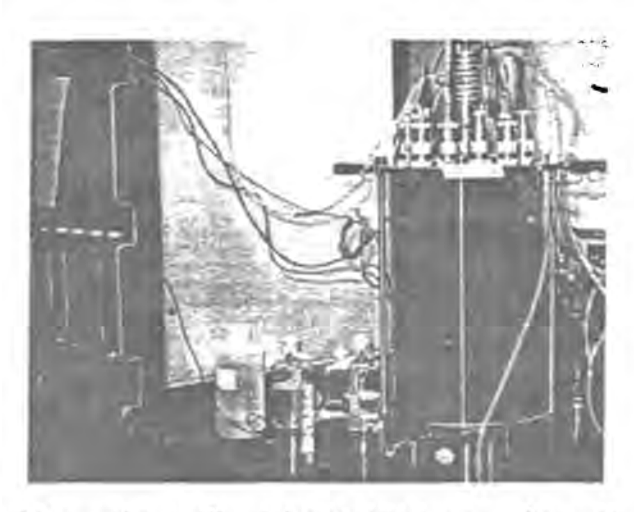
وعلى الرغم من هذه القدرات الهائلة, فلا توجد إنزيمات بلا عيوب فى خليط التفاعل الأخير مابين ٠,٥ % و٢% وبعد تقليل أو إزالة كلاً من هذه المعوقات فى الاستغلال التجارى للإنزيمات هدفا للكثير من الأبحـــاث الحاليـــة، ويمكـــن التغلب على بعض الصعوبات الكامنة فى استخدام الإنزيمات القابلـــة للـــذوبان بتثبيت الإنزيمات المعزولة،وبذلك تتحول إلى صور غير قابلة للذوبان، ويمكـــن تثبيت الخلايا كلها ،سواء كانت حية أو ميتة واستخدامها لإجراء تفاعلات معينة، وهذا يفيد على وجه الخصوص،عندما يحتاج التفاعل إلى مشـــاركة إنزيمـــات

ميكروبية عديدة، وتشمل مميزات شل حركة الإنزيمات أو كل الخلايا على زيادة ثبات الإنزيم،وتقليل تكلفته ،وسهولة فصله واستخلاصه.

إنتاج المواد الكيميائية عن طريق التخمر الميكروبى

The production of chemicals by microbial fermentation

التخمر بصفة عامة هو عملية تتم فى دفعة واحدة **abatch process** ينمو فيها كائن مجهرى لم تشل حركته فى جهاز تخمر، وجهاز التخمر عبارة عن خزان أو وعاء كبير يحتوى على ميكروب فى وسط غذائى (شكل ٥-٢)، ويحتــوى وسط النمو على مصدر كربونى كالجلوكوز،أو النشا المتميــىء أو المــولاس، ومصدر بروتينى أو نتروجين مثل وجبة فول صويا أو شــراب ذرة ثقيــل أو وجبة بذرة قطن، أو مصدر فيتامين مثل خلاصة الخميرة،ومعادن ومواد غذائية متنوعة، ويزود جهاز التخمر أيضاً بوسائل تحكم لتنظيم درجة الحرارة والأس الهيدروجينى للحساء الذى ستنمو عليه الخلايا.



شكل ٥-٢ جهاز تخمر معملى. يجرى استخدام خزان المخمر الذى يتسع لــــ ١٤ لتــرا فــى إنتــاج-٢ ketogluconicacid ، وهو حمض عضوى على درجة غذائية ينتجه الفطــر Acetobacter ، ويــزود الجهــاز بوسائل تحكم ومراقبة لتنظيم درجة الحرارة والأس الهيدروجينى وعملية إدخال الأكسجين والتغذية.

وكما هو معروف بصورة تقليدية، كانت التخمرات لا هوائية،فى حين يحتاج العديد من تفاعلات التخمر حالياً إلى أكسجين، ومنتجات التخمر إمـــا أن توجـد بداخل الخلايا أو تفرز فى الوسط، والعمليات المطلوبــة لاســتخلاص المنــتج وتنقيته بسيطة إلى حد ما بالنسبة للمواد المفرزة.

وكما ذكرنا سابقاً ، توفر التخمرات الميكروبية العديد من الإنزيمــات التــى تستخدم تجارياً، فالإنزيمات مثل البروتينات الأخرى، هى عبارة عن بوليمرات تتكون من ارتباط الوحدات البنائية للأحماض الأمينية ببعضها لتكوين جزيئـــات كبيرة، ومع ذلك فبعض الجزيئات الإنزيمية معقدة التركيب،لأنها تحتوى علـــى عناصر أخرى من الكربوهيدرات أو الليبيد.

وتوفر الكائنات المجهرية أيضاعدد من البوليمرات غيرالبروتينية (جدول ٥-٣). وكل المواد المدونة تقريباً سكريات عدادية تكونت من ارتباط سكريات بسيطة مثل، الجلوكوز أو الفركتوز، والاستثناء هو بولى-بيتا-هيدروكسيبتيرات، الذى يتركب من حمض دهنى ذى أربع ذرات كربون،يسمى بيتا-هيدروكسيبتيرات، وتستخدم العديد من البوليمرات غير البروتينية فى صناعة الأغذية كعوامل مستحلبة، وكمواد تضفى الحجم أو النسيج للمنتجات الغذائية، وتستخدم أيضاً كقوالب غير قابلة للذوبان لشل حركة الإنزيمات والخلايا.

جدول ٥-٣ الإنتاج الميكروبيولوجى للبوليمرات عن طريق التخمر

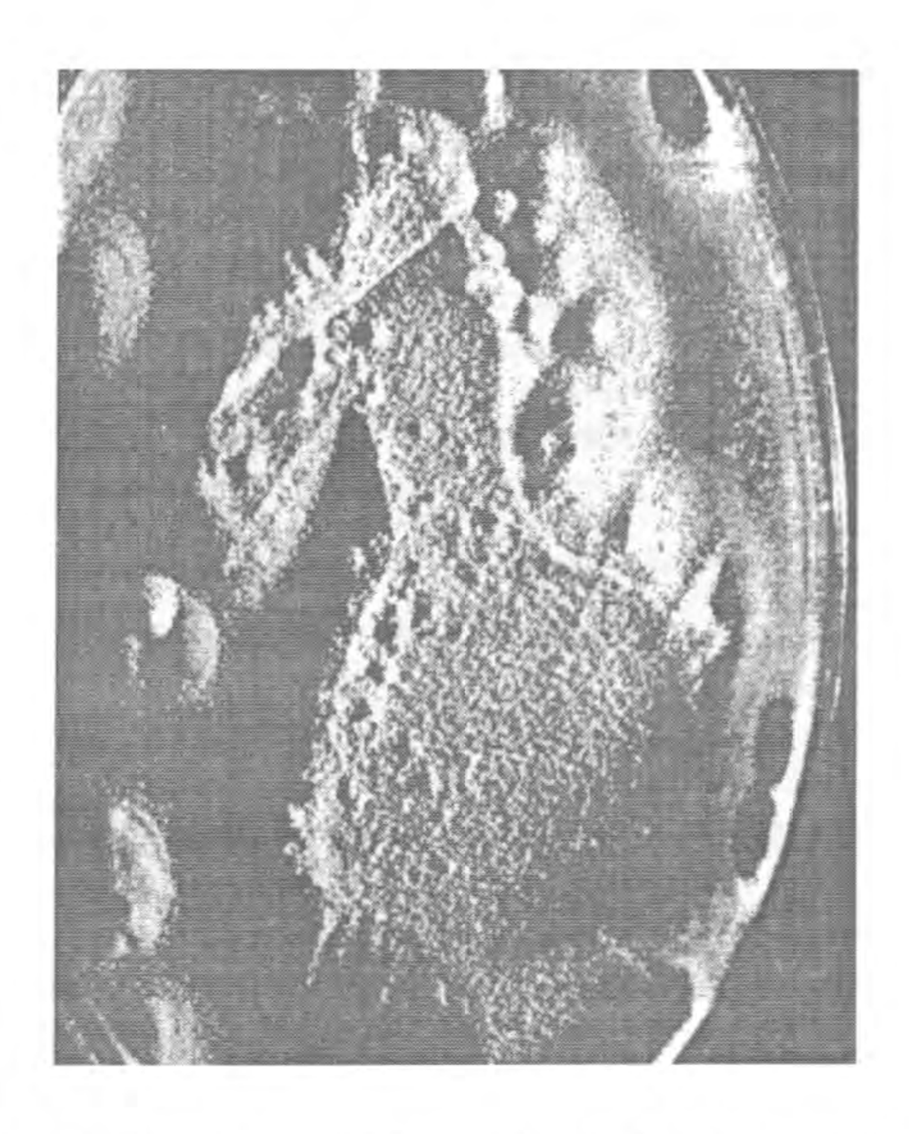
Polymers	Microorganisms
Alginate	*Azotobacter vinelandii*
	Pseudomonas aeruginosa
Cellulose	*Acetobacter* sp.
Curdlan	*Agro bacterium* sp.
Dextran	*Acetobacter* sp.
D-Fructose homopolymer	*Zymomonas mobtlis*
Levan	*Bacillus* sp.
	Leuconostoc mesenteroides
	Pseudomonas sp.
	Serratia marscens
Phosphomannan	*Hansenula capsulata*
	Hancenula holstii
	Physarumpolycephalum
	Rhizobium melilozi
Poly-beta-hydroxybutyrate	*Alcaligeneseutrophus*
	Methylobacterium organophilum
Scieroglucan	*Sclerotium glucanicum*
Xanthan	*Xanrhomonas campestris*

وربما تكون المضادات الحيوية أكثر الجزيئات الأصغر أهمية التى تنتجها الكائنات المجهرية ، ومنذ أن اكتشف ألكسندر فليمينج١ بالصدفة المضاد الحيوى البنسلين فى عام ١٩٢٨، فقد أحدثت هذه المعوقات الطبيعية للنمو الميكروبى تغيراً جذرياً فى الطب، وأنقذت حياة العديد من البشر(شكل٥-٣)، والأمراض البكتيرية مثل التهاب الرئة**pneumonia**، التى يمكن أن تعالج حالياً بالمضادات الحيوية،لم تعد البلاء الذى كان موجوداً من قبل. بالإضافة إلى ذلك،فبعض

١ـ ألكسندر فليمنج: بكتيريولوجى بريطانى. مكتشف البنسلين عام ١٩٢٨.

المضادات الحيوية مثل الادريميسين**adrimycin** على سبيل المثال،لها تـــأثيرات مضادة للأورام،وتستخدم فى العلاج الكيماوى للسرطان.

وحتى داخل التصنيف العام للمضاد الحيوى ،فهناك عدة أنواع مختلفة مـــن التركيبات الكيميائية، حيث يوجد ما يزيد على ٢٠٠٠مادة مضاد حيـــوى، وقـــد دون عدد قليل منها فى جدول ٥-٤، تم التعرف عليها ، وتشمل هذه الجزيئـــات على الببتيدات، والكربوهيدرات والهيدروكربونات ومشتقات البنزين و سلســـلة من الأنواع الكيميائية الأخرى، ولا تزال وظيفة هذه المركبات داخل الكائنـــات المجهرية التى تصنعها غير معروفة، وربما يكون الهدف منها مساعدة الكـــائن على الدفاع عن بيئته الذى يعيش فيها ضد الكائنـــات الغريبـــة الأخرى،وقتـــل الميكروبات الغازية،لكنه لا يحتمل أن تكون تلك هى الوظيفة الوحيدة.



شكل ٥-٣ صورة لعفن البنيسيليوم ينمو فى طبق بالمعمل. و يعد العفن من هذا الجنس مصدراً للمضادات الحيوية من عائلة البنسلين.

جدول ٥-٤ الإنتاج الميكروبيولوجى للمضادات الحيوية عن طريق التخمر

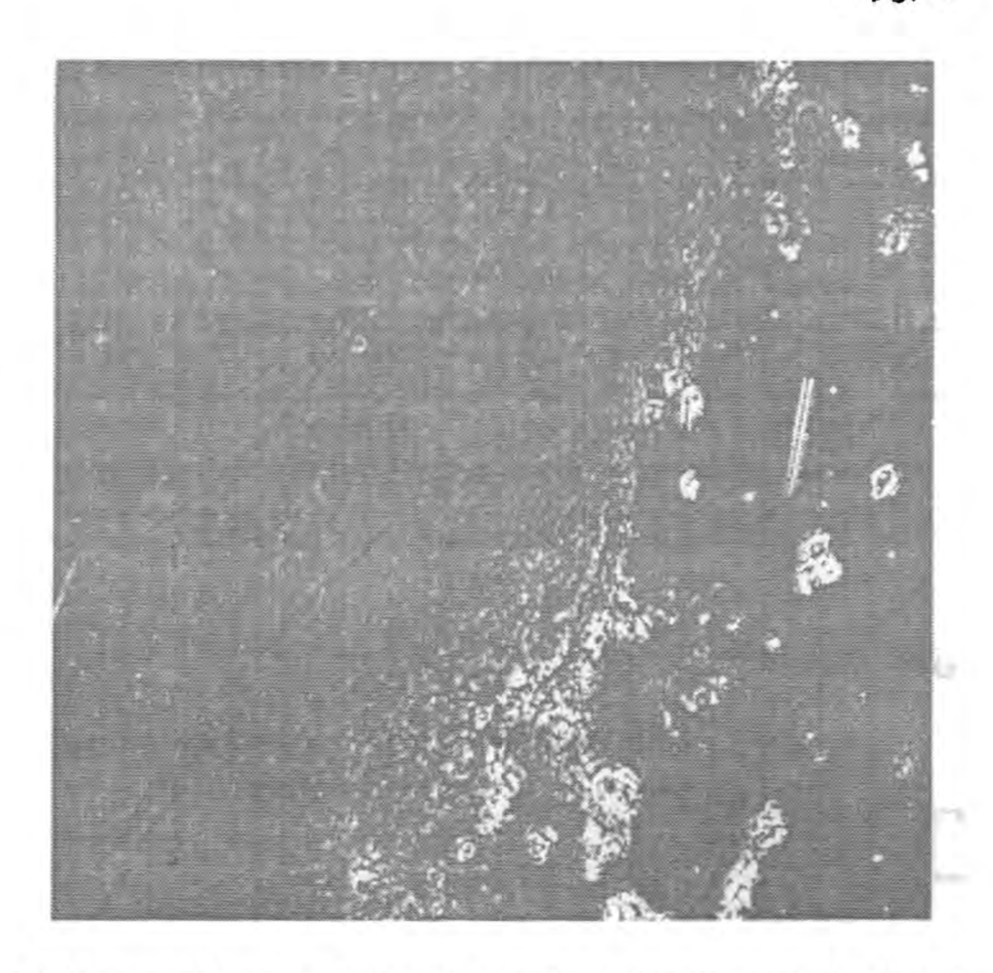
Antibiotics	Chemical classes	Microorganisms
Amphotericin **B**	**Tetraene**	*Streptomyces nod usus*
Cephalosporin C	Beta-lactani	*Cephalosporium acremonium*
Chloramphenicol	Nitroaromatic	*Streptomyces venezuelae*
Chlortetracycline	**Tetracene**	*Streptomvces aureofaciens*
Clavulanic **acid**	Beta-lactam	*Streptomvces clavuligerus*
Demeclocycline	**Tetracene**	*Streptom.vces aureofaciens*
Erythromycin	**Macroide**	*Streptomvces erythreus*
Gentamicin C	Aminoglucoside	*Micromonospora purpurea*
Gramicidins	**Polypeptide**	*Bacillus brevis*
Griseofulvin	**Coumarone +** Hydroaromatic ring	*Pen icillium griseofulvum*
Hydroxytetra- cycline	Tetracene	**Streptomyces rimosus**
Kanamycin A	Aminoglycoside	*Streptomyces kanamyceticus*
Lincomycin	Amino acid + Carbohydrate	*Streptomyces lincolnensis*
Neomycins	Aminoglycoside	*Streptomycesfradiae*
Nystatin	**Heptaene**	*Streptomyces noursei*
Oleandomycin	Macrolide	*Streptomyces antibioticus*
Paromomycin	**Aminoglvcoside**	*Streptomyces rimosus* forma *paromomycinus*
Penicillins	**Beta-Lactam**	*Penicillium chiysogenum*
Rifamycins	Aliphatic + aromatic	*Nocardia mediterranei*
Streptomycin	Aminoglycoside	*Streptomyces griseus*
Sulfazecin	Beta-Lactam (monobactam)	*Pseudomonas acidophilus*
Tetracycline	Tetracene	*Streptomyces aureofaciens*
Tyrocidines	Polypeptide	*Bacillus brevis*

ويعد وجود مثل هذه السلسلة الكبيرة من المضادات الحيوية مكسبا للطب، والسبب الأول ،هو أن الكائنات المجهرية الممرضة تتفاوت فى قابليتها للتأثر بالمضادات العديدة، فوجود سلسلة كبيرة من المواد للاختيار منها يحسن الفرص لإيجاد المضاد الحيوى المؤثر ضد ميكروب معين، والسبب الآخر، احتمال أن تصبح البكتيريا مقاومة لمضاد معين إذا ما تعرضت له فترة من الوقت، فوجود المضادات الحيوية المتنوعة يساعد على منع ظهور الأصناف المقاومة.

وعلى مر السنين،كانت المضادات الحيوية مصدرا كبيرا لربح الشركات الدوائية، ومن ثم قدمت برهاناً لا يقبل الشك فى أن الكائنات المجهرية مصدر مفيد للمنتجات التجارية،وقدرت مبيعات المضادات الحيوية فى الولايات المتحدة وحدها فى عام ١٩٨٦، فى مرات مختلفة بقيمة تتراوح ما بين واحد ونصف مليار دولارا إلى ثلاثة مليارات من الدولارات، وأخيراً، ساهمت المضادات الحيوية أيضًا فى صناعة التخمر،لأن تصنيعها قد استخدم كأرضية ثابتة لتطوير وسائل التخمر الجديدة،وفى أساليب العزل والتنقية أيضاً.

وتشمل الجزيئات الصغيرة الأخرى التى تنتجها التخمرات الميكروبية على الأحماض الأمينية والأحماض العضوية(شكل ٥-٤)، ومعظم العشرين حمضاً أمينياً أو نحو ذلك، الموجودة فى البروتينات يمكن أن تنتج بهذه الطريقة (جدول ٥-٥) ، وتستخدم الأحماض الأمينية كإضافات غذائية آدمية أو كعلائق للحيوان، وبالإضافة إلى ذلك،تستخدم كمواد وسيطة لتخليق منتجات تجارية،مثل الأسبرتام المحلّى،الذى يستخدم على نطاق واسع فى إنتاج المشروبات الخفيفة الخالية من السكر،والمنتجات الأخرى ذات السعرات المنخفضة، ويعتبر

الأسبرتام**aspartame** ببتيد ثنائى يحتوى على مادة الفينيـل الانـين، وحمـض الأسبرتيك.



شكل ٥-٤ صورة مصغرة للفطر عصيات الخلية Acetobacter ، يستخدم هذا الفطـر فـى صـنع عـدة منتجـات، مـن بينهـا -٢ ketogluconic acid

جدول ٥-٥ إنتاج الأحماض الأمينية بواسطة التخمر الميكروبى

Amino acids	Microorganisms
DL-Alanlne	*Bret' ibacteriumflavum*
L-Argxnine	*Brevibacterium flavum*
L-Citrulline	*Bacillus subtilis*
L-Glutattuc acid	*Brevibactenumflavum*
L-Histidmne	*Corynebacterium glutamicum*
L-Isoleucjne	*Brevibacteriumflavum*
L-Leucine	*Brevibacterium lactofermentum*
L-LvStne	*Coiynebacterium glutamicum*
L-Methionine	*Brevibacteriumflavum*
L-Ornithine	*Micro bacterium ammoniaphilum*
L-Pheflylalanifle	*Brevibacterium lactoifermentum*
L-Prohne	*Corynebacterium glutamicum*
L-Serine	*Corynebacterium hydrocarboclastus*
L-Threonine	*Corynebacterium glutamicum*
L-TryptOphan	*Brevibacterium flavum*
L-Tyrosine	*Coiy' nebacterium glutamicum*
L-Valine	*Brevibacterium lactofermentum*

وتعتبر أحماض**arachidonic** و**eicosapentaentaenoic** مــن الأحمــاض الدهنية طويلة السلسلة ذات الأدوار الغذائية المهمة، ويعتبر حمض**arachidonic** الذى يحتوى على ٢٠ ذرة كربون وروابط مزدوجة من ٤ كربون-إلى-كربون أحد الأحماض الدهنية الأساسية التى لا يمكن أن تكونها الحيوانات الراقية،ولذلك يجب تناوله مع الوجبة الغذائية، ويعتبر نقطة البداية لتصنيع عدد من العوامــل الفسيولوجية النشطة الأكثر فاعلية،التى تشمل **rostaglandins**) مركبات حمضية

من شبيهات الهرمونات القابلة للذوبان فى الدهنيات) و**leukotrienes**، وتؤثر هذه المركبات على سلسلة كبيرة من الأنشطة الفسيولوجية؛ فالبعض منهـا يجعـل صفائح الدم أقل التصاقاً،وقد تساعد نتيجة لذلك على منع تكون الـتجلط الشـاذ، ويؤثر البعض الآخر على انقباض العضلات الرقيقة،وتشمل تلـك العضـلات الموجودة فى الأوعية الدموية،أو التى تنظم وظيفة الكُلَى، ويعتبر التأثير علـى انقباض الوعاء الدموى ووظيفة الكلى من العناصر المهمة فى تنظيم ضغط الدم، ولا يزال يشارك الـبعض الآخـر مـن**leukotrienes** و**prostaglandins** فـى تفاعلات الحساسية والالتهاب، ولمعظم هذه المركبات تطبيقات طبية فعالـة،إما كعقاقير، أو كأهداف للعقاقير.

ويعتبر حمض**Eicosapentaenoic** حمضاً دهنياً ذا"omega-٣"،الذى يعنى أن له روابط مزدوجة بين الكربونات ٣و٤، وقد كانت له جاذبية كبيرة فى الآونـة الأخيرة،لاحتمال استخدامه كمانع للسكتات القلبية،بسبب تأثيراته الإيجابية علـى تركيزات كلوسترول الدم، وتوجد أحمـاض**arachidonic** و**eicosapentaenoic** بصورة طبيعية فى زيوت بعض الأسماك،التى تشمل السلمون و التونا، وينـتج الفطر**Porphyridium centrum** أيضاً الأحماض الدهنيـة،ويمكن أن يصـبح مصدراً تجارياً مهماً.

ولبعض المركبات الأكثر جذباً التى تنتجها الكائنات المجهريـة خصـائص دوائية، يبدو أنها لا تؤثر على الكائن المنتج نفسه(جدول ٥-٦)، وتشـمل هـذه على مركبات تؤثر على الاستجابات المناعية(معدلات المناعة)،علـى سـبيل المثال، والعوامل التى تخفف من الإحباط(مضادات الإحباط) وتخفض من ضغط

لدم(**hypotensives**)،أو لها تأثيرات مضادة للالتهابات، كل الأنشطة التى يبـدو أنها غير مفيدة للميكروبات نفسها.

جدول ٥-٦ الإنتاج الميكروبيولوجى من المركبات النشطة دوائيا

Compounds	Pharmacological ActivitieS	Microorganisms
Amastatin	Immunomodulator	*Streptomyces* **sp.**
Ascofuranonc	Antilipidaemic	*Ascophyta viciae*
Bestatin	Immunomodulator	*Streptomyces Oliroreticuli*
١ ,٣-Diphenethylurca	Anti-depressant	*Streptomyces* sp.
Dopastin	Hypotensive	*Pseudomonas* sp.
Esterastin	Lmmunomodulator	*Strepwmyces lavendulae*
Forphenicinc	Immunomodulator	*Streptomycesfulvoviridis*
Fusaric acid	Hypotensive	*Fusarium* sp.
Griseofulvin	Anti-inflammatory	*Strepromyces griseofulvum*
N-acetylmuramyl tripeptide	Immunomodulator	*Bacillus cereus*
Naematolin	**Coronary Vasodilator**	*Naematolomafasciculare*
Oosponal	**Hypotensive**	*Gloeophyllum striatum*
Oudcnonc	**Hypotensive**	*Oudemansiella radicata*
I Phialocin	**Anticoagulant**	*Phialocephala repens*
Slaframine	**Salivation inducer**	*Rhizoctonia leguminicola*
Zearalenone	**Oestrogenic**	*Gib berella zeae*

وقد لا يكون وجود هذه العوامل فى الكائنات المجهرية أكثر من صدفة بحتة، ولكنها على أية حال صدفة سعيدة، وقد يكون نشاطها الدوائى فـى الحيوانـات الراقية،غير مرتبط بوظائفها البيولوجية الحقيقية فى الكائنات المنتجة لها، ومـع

ذلك فقد تعكس الصدفة شمولية الطبيعة، وقد تتشابه الأشكال الجزيئية فى مواقع تأثير العوامل فى الثدييات والميكروبات ، على الرغم من أنه يرجح أن تكون النتائج البيولوجية للتأثيرات مختلفة فى مجموعتى الكائنات.

ومن غير المتوقع أيضاً لحد ما ،إنتاج الكائنات المجهرية لعدد كبير من المواد الكيميائية ذات النكهات أو الروائح المستحبة(جدول٥-٧)، ويجرى فحص بعض من هذه المواد لتكون بدائل للعوامل المكلفة من مكسبات النكهة والرائحة فى الأغذية والعطور.

وتشمل سلسلة المركبات الكبيرة المتنوعة التى تنتجها التخمرات الميكروبية على الأصباغ، والكوابح الإنزيمية،وخافضات التوتر، والهرمونات النباتية، ومبيدات الأعشاب، ومبيدات الحشرات(جدول٥-٨)، والوظائف البيولوجية الطبيعية لبعض من هذه العوامل واضحة؛ فعلى سبيل المثال،تعمل خافضات التوتر **surfactants** على استحلاب الأغذية غير القابلة للذوبان فى الماء وإلا فلن تجد الميكروبات التى تتغذى عليها وسيلة للتعامل معها، وتساعد خافضات التوتر أيضاً الكائنات العضوية المنتجة على أن تمتز وتفرز من الأسطح التى تنمو عليها، والدور الطبيعى للعوامل الأخرى من المنتجات الميكروبية المتنوعة،مثل الهرمونات النباتية ومبيدات الحشرات ليس واضحاً، مثل العوامل الدوائية التى ذكرناها من قبل.

جدول ٥-٧ الإنتاج الميكروبيولوجى من المواد الكيميائية المكسبة للطعم والرائحة

compounds	Aroma/flavour notes	Microorganisms
Anisaldehyde	Anise-like	*Trametes sauvolens*
Benzaldehyde	Almond-like	*Trametes sauvolens*
Benzyl alcohol	Fruity	*Phellinus igniarius*
		Phellinus lcevigatus
		Phellinus tremulus
Cinnamic **acid** methyl **ester**	Fruity, Iasmine	*Znocybecorydulina*
Citronellol	**Rose-like**	*Ceratocystis variospora*
		Trametes odarata
Citronellyl acetate	Fruity, **rose-like**	*Ceratocystis variospora*
Gainnia-decalactone	**Peach**	*Ceratocystis moniliformis*
		Sporobolomyces odorus
Diacetyl	Buttery	*Streptococcus diacetylactis*
٢,٦-Dihydro-٢-	Fruity	*Mycoacia uda*
Methylacetophenone		
p-Alpha-dimethyl	Grassy	*Mycoacia uda*
Phenyl alcohol		
Ethyl **benzoate**	Fruity	*Phellinus igniarius*
Ethyl butyrate	Fruity	*Lactobacillus casei*
		Pseudomonasfragi
		Streptococcus diacetylactis
Geranial	**Rose-like**	*Ceratocystis variospora*
Geraniol	Rose-like	*Ceratocystis vartospora*
Geranyl acetate	**Rose, lavender**	*Ceratocystis varwspora*
Linalool	**Floral**	*Ceratocystis variospora*
		Phellinuss igniarius
		Phellinus tremulus
Methyl **amsate**	Amse-hke	*Trametes sauvolens*
Methyl **benzoate**	Fruity	*Phellinusigniarius*
		Phellinuslaevigatus
Methyl benzoate	Fruity	*Phellinus tremulus*
p-Methylacetophenone	**Fruity, floral**	*Mycoacia uda*
p-Methylbenzyl alcohol	**Hyacinth, Gardenia**	*Mycoacia uda*
Alpha,٤-methyl-	Fruity	*Mycoacia uda*
Cyclohex-٣-ene		
Ethyl alcohol		
Methyl-p-methoxy-phenylacetate	**Anise-like**	*Trametes odorata*
Methylphenylacetate	Honey-like	*Trametes odorata*
Methyl salicylate	Wintergreen	*Phellinus igniarius*
		Phellinus laevigatus
		Phellinus tremulus
Neral	**Rose-like**	*Ceratocystis variospora*
Nerol	Rose-like	*Trametes odorata*
Phenylethyl alcohol	Rose-like	*Phellinus igniarius*
		Phellinus tremulus
٦-**Pentyl-alpha-pyrone**	**Coconut-like**	*Trichoderma viride*
Tetramethylpyrazines	Nutty	*Corynebacterium Glutamicum*
p-Tolualdehyde	Almond-like	*Mycoacia uda*

جدول ٥-٨ إنتاج مركبات متنوعة من التخمر الميكروبيولوجى

Compounds	Properties	Microorganisms
Antipain	Protease inhibitor	Various *Streptomyces*
Astaxanthin	Pigment	*Phaffia rhodozyma*
Avermectjn	Anthelminthic	*Streptomyces avermitilis*
Carotenoids	Pigments	*Dunaliella bardarwil* (alga) *Trentepohlia* (alga)
Chymostatin	Protease inhibitor	Various *Streptomyces*
Dopastin	Dopamine-beta Hydroxylase inhibitor	*Pseudomonas* sp.
Elastatinal	Elastase inhibitor	Various *Streptomyces*
Emulsan	Surfactant	*Acinetobacter calcoaceticus*
Fusaric acid	Dopamine-beta Hydroxylase inhibitor	*Fusarium* sp.
Gibberellins	Plant hormones	*Gibberellafujikuroi*
Guanosine	Flavour enhancer Precursor	*Bacillus subtilis*
Herbicidin	Herbicide	*Streptomyces saganonensis*
Inosine	Flavour enhancer Precursor	*Bacillus subtilis* *Brevibactertum Ammomagenes*
Leupeptin	Protease inhibitor	Various *Streptomyces*
Oudenone	Tyrosine hydroxylase Inhibitor	*Oudemansiella radicata*
Pepstatin	Protease inhibitor	Various *Streptomyces*
Phosphatidyl Ethanolamine	Surfactant	*Rhodococcus* sp.
Piericidin	Insecticide	*Streptomyces mobaraensis*
Polyketides	Pigments	*Monascus purpureus*
Polymyxin B	Surfactant, antibiotic	*Bacillus polymyxa*
Rhainnolipids	Surfactant	*Pseudomonas aeruginos*
Sophorolipids	Surfactant	*Sorulopsis* sp.
Surfactin	Surfactant	*Bacillus subtilis*
Tetranactin	Miticide	*Streptomyces aureus*
Trehalose lipids	Surfactants	*Rhodococcus Erythropolis*
Vitamin $B_{١٢}$	Vitamin	Bacillus sp. *Propionobacterium Shermanii* *Pseudomonas* sp.

وليست جميع المواد التى تنتجها الكائنات المجهرية مفيدة للإنسـان، وأحـد الأمثلة على المنتجات الضارة بالإنسـان aflatoxin ،وهـى مـادة مسـرطنة نشطة،ينتجها فطر ينمو على الحبوب والفول السودانى، وبالإضافة إلى ذلك فإن فطر الدابرة الأرجواني Claviceps purpura الذى ينمو على الحبوب البقوليـة وبعض الحشائش،ينتج مجموعة من المركبـات تعـرف بـأشباه القلويـات الأراجونية

وعندما يتناول الإنسان أو الحيوان هذه المركبات،فإنها تؤثر على الجهـاز العصبى وتسبب اضطرابات عنيفة(رقصة القديس فينوس)، والغرغرينا والوفاة ، ويشتق من حمض ليسرجيك ، ديثيالاميـد حمـض ليسـرجيك diethylamide lysergic acid ،وهو عقار الهلوسة المعروف بـ LSD ، وعلى الرغم مـن التأثيرات المشؤمة لأشباه القلويات الأرجوانية، فإنها على الرغم من ذلك مفيدة، فعندما تستخدم بمقادير مناسبة،فإنها تتحكم فى تقلصات الرحم أثنـاء الـولادة، وتتحكم فى النزيف haemorrhage.

وأياً كان تفسير وجود المواد الكيميائية الميكروبية العديدة ،فسوف يتضح إن التخمرات هى المصدر الرئيس للمركبات غير المتوقعة التى قد تكـون مفيـدة للطب البشرى، وفى اليابان، يجرى عمل اختبارات علمية على العديد من المواد النشطة دوائياً باعتبارها عقاقير دوائية ممكنة، وكنمـاذج لتوضـيح الظـواهر الدوائية، ومن المتوقع أيضًا أن تزيد تطبيق المنتجات الميكروبية على سلسـلة متنوعة من الاستخدامات الأخرى.

منتجات كيميائية من كائنات مجهرية مشلولة الحركة

Products of chemicals by immobilized microorganisms

ربمـــا يكون لاستخدام الخلايا المشلولة الحركة فـــى التخليـــق الكيميـــائى الحيوى مزايا عديدة تفوق استخدام نظم التخمر ، فقد يمكـــن الحصـــول علـــى كثافات أعلى بواسطة الخلايا المجمدة عما يحصل عليه من التخمرات التقليدية ، وقد تعطى نواتج أعلى من المنتج من حجم تفاعل معين ، وتعنى هذه الإنتاجيـــة المرتفعة ، إنه سيكون هناك تلوثًا أقل ناتج من كل وحدة منتج ، وعلاوة علـــى ذلك ، تكون العملية المستمرة للتخمر أكثر سهولة .

وقد يكون للخلايا المشلولة الحركة أيضا مميزات تفوق الانزيمات المنقـــاة والمثبتة ، حيث يمكن أن يقلل استخدام الخلايا المشلولة الحركة تكلفة الإنـــزيم ، وسوف يقلل الحاجة إلى استخراج الإنزيم وتنقيتـــه ، وقـــد تكـــون الإنزيمـــات الموجودة فى الخلايا أكثر ثباتًا أثناء العمليات المطلوبة لتخليـــق المنـــتج مـــن الإنزيمات المنقاة التى تم تثبيتها .

بالإضافة إلى ذلك ، فالتخليق الأكثر تعقيدًا قد يصبح سهلاً باستخدام الخلايا المشلولة الحركة خاصة عندما تستخدم الخلايا الحية ، وفى غالبيـــة الأبحـــاث الأولى مع الخلايا المثبتة ، لم يكن مطلوبًا سوى إنزيم واحد لتحويل الركائز إلى منتجات ، وتلائم الخلايا الميتة هذا الغرض طالما كانت تحتوى على إنزيم نشط ، إلا أنه فى الأونة الأخيرة ، اشتملت التحويلات الكيميائية العديد من المراحـــل الإنزيمية ، والتى كانت تقوم بها الخلايا الحية بصورة أفضل ، وتجديد العوامل المساعدة غير الإنزيمية ، التى قد تكون ضرورية لاستمرار عمل الإنزيم فـــى بعض تسلسلات التفاعل ، يمكن أن تقوم بها أيضًا الخلايا الحية .

يمكن تثبيت الخلايا بأيـــة طريقة من طرق التجميد الست المختلفة ، وأشهر هذه الطرق، هى اصطياد الخلايا فى مادة نسيج بيخلوية بوليمرية، وقد يكون البوليمر

مخلقاً،مثـــل البــــولى أكريلامايــــدpolyacrylamide أو بـــولى فينيـــل كلوريدpolyvinylchloride أو بولى ارثينpolyurethane، والتى ربما تكــون معروفة بصورة أفضل فى استخداماتها فى اللدائن ومواد العزل، والبديل عــن ذلك، يمكن أن يكون البوليمر من مصدر طبيعـــى، فالآجــارAgar و calcium alginate وK-carrageenan تنتج جميعها من الطحالب،وهى من بـــين المـــواد الطبيعية التى يمكن استخدامها.

ويتضمن أسلوب ثان لتثبيت الخلايا ربطها عرضياً بالكواشف الكيميائية، وفى إجراء ثالث،يمكن تثبيت الخلايا بربطها كيميائياً ببعض البوليمرات التخليقية أو نفس البوليمرات الطبيعية المستخدمة فى اصـــطياد الخلايـــا أو بـــالمواد غيـــر العضوية مثل الزجاج أو كرات الصلب الذى لا يصدأ أو الرمل أو أوكســيدات المعادن، وطريقة التثبيت الرابعة،هى امتصاص الخلايا لأنسجة التبادل الأيونى بـــين الخلويـــــة مثـــــلcellulose diethylaminoethyl أوSephadex أوcarboxymethyl cellulose ،وتتضمن العملية الخامسة على تغليف الخلايا فى كبسولات صغيرة فى الأغشية الاصطناعية المعروفـــة بالليبوســومات،أو فـــى الأنسجة المجوفة،والإجراء الأخير،هو تلبيد الخلية cell flocculation عن طريق ربطها بالكائنات المجهرية بطريقة فيزيائية بدلاً من الطريقة الكيميائية.

وعند اختيار نسيج بين خلويmatrix ،يجب الأخذ فى الاعتبار عــدداً مــن العوامل، فيجب أن تكون المادة المثبتة ثابتة ومتوافقة مع الميكروب المســتخدم ومع ومواد ومنتجات التفاعل، ويجب ألا يمتص الإنزيم المحفز للتفاعــل فـــى المادة التى يثبت بها ، ولا تذوب المادة التى تثبته فى المنتج.

وتنتج الكائنات المجهرية المشلول حركتها العديد من أنواع المركبات نفسها،كالتى تخلق فى عمليات التخمر،ومع ذلك، فبالإضافة إلى المميزات التى ذكرت عن تثبيت الكائنات العضوية،فغالباً ما تتيح أساليب التثبيت استغلال الميكروبات التى لا تستخدم عادة فى تفاعلات التخمر، وينطبق ذلك على تخليق الأحماض الأمينية والأحماض العضوية،على سبيل المثال.

وعلاوة على ذلك،فالكائنات المجهرية المشلولة الحركة ، يمكن أن تجرى تفاعلات وتصنع منتجات لا يمكن الحصول عليها من طرق التخمر الأكثر تقليدية، وفى حين يتضمن إنتاج المضاد الحيوى من التخمرات عادة التخليق الكلى للمركبات، فإن الخلايا المشلولة الحركة تقوم بثلاثة أنواع مختلفة من العمليات، و يمكنها أيضاً أن تقوم بتخليق مضاد حيوى بالكامل ،كما يحدث فى إنتاج مركبات مضاد الباسيل**bacitracin** والبنسيلين**G(penicillin G)** والإستربتوميسين**streptomycin** وهى المضادات الحيوية المستخدمة على نطاق واسع ، فى حين تصنع الخلايا المشلولة الحركة أيضاً **precursors** (أى مواداً تصنع منها مواد أخرى)،لاستخدامها فى تخليق عدد مختلف من المضادات الحيوية، وتحويل الـ **precursors** إلى منتجات نهائية، ومثال على ذلك،تحويل **penicillin G** الذى يتم الحصول عليه من تفاعل تخمرى،فيتحول أولاً إلى مادة**٦-aminopenicillanic acid** وبعد ذلك فى وجود **phenylglycine methyl ester** يتحول للمنتج النهائى الإمبيسلين**ampocillin** (شكل ٥-٥).

وتحفز الخلايا المشلولة الحركة أيضاً بعض تعديلات الكربوهيدرات المهمة تجارياً،التى لن يكون معظمها مفيد فى طرق التخمر،حيث يجرى على المنتج المطلوب تفاعلات أخرى، ومن بين هذه التعديلات الكربوهيدراتية،إنتاج الشراب

عالى الفركتوز الذى يستخدم كثيراً كمادة محليّة(لها طعم السكر) فى المشروبات الخفيفة والمنتجات الأخرى المستمدة،إما من مادة سكر الجلوكوز البسـيطة، أو من النشا النباتيinulin عديد السكريد . وأخيراً،تشمل المنتجات المتنوعـة مـن الخلايا المشلولة الحركة مجموعة متنوعة من المواد،مثل العوامـل المسـاعدة cofactors المستخدمة فى التفاعلات الإنزيمية،والـــprecursors المسـتخدمة فـى صـنع اللـدائن،والبوليمرات الأخـرى والهرمـون النبـاتى حمـض الـــgibberllic، وعلى الرغم من أن بعض من هذه المواد بما فيهـا حمـض الـــgibberllic يمكن تحضيرها بطرق التخمر،إلا أن الطرق المفضـلة فـى صناعتها،تستخدم تكنولوجيا الخلية المثبتة .

Penicillin G

6-Aminopenicillanic acid

شكل ٥–٥ . تخليق الأمبيسلين ، الأمبيسلينG،الذى ينتجه فطر Penicillium يتحول إلى حمض ٦-aminopenicillanic بواسطة أى عـدد من الكائنات المجهرية، يتحول بعد ذلك فى مرحلة ثانية الحمض٦-aminopenicillanic و ملح ميثيل فينو جليسين ميكروبيا إلى المضاد الحيوى الأمبيسلين المستخدم على نطاق واسع .

بيد أن لاستخدام الخلايا المشلولة الحركة عيوب محتملة، فكثرة الإنزيمات فى الخلايا قد ينتج عنه تفاعلات ثانوية غير مرغوبة، ويمكن أن يحـدث التلـوث البكتيرى، وقد يكون النشاط الحفزى للإنزيمـات الخلويـة أقـل مـن نشـاط

الإنزيمات المنقاة المشلولة الحركة ، بالإضافة إلى ذلك ، فالنسيج البينخلوى غير القابل للذوبان، قد يعوق نقل المواد الداخلة والخارجة من الخلايـــا، ويمكـــن أن يؤدى ذلك إلى إعاقة التخلص من المنتجات ذات الوزن الجزيئى العالى، ودخول الأكسجين الذى تحتاجه الخلايا، ويمكن أن يكون له أيضاً تأثير سيىء على الأس الهيدروجينى للخلايا،إن لم يمكن سكب منتجات التفاعل الحمضية أو القاعديـــة للخارج.

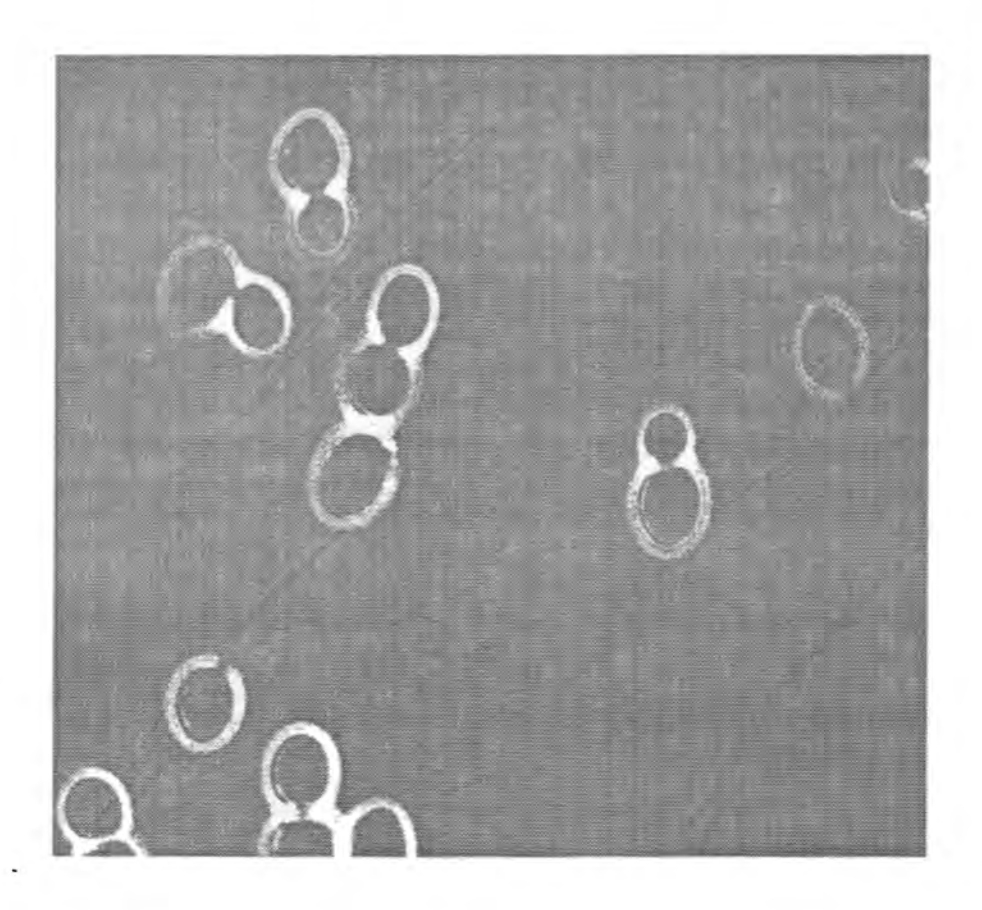
وهناك عدد من العوامل تحدد ما إذا كان من الأفضل استخدام طرق الخلية المشلولة الحركة أو الطرق التقليدية لصنع منتج معين، وتشمل هذه العوامل على تكاليف تربية وإعداد الخلايا المشلولة الحركة ، والنشـــاط الإنزيمـــى وثبـــات الخلايا، وإمكانية إعادة استخدام الخلايا والإنتاجية الكلية للنظام ،والاحتياجـــات من رأس المال المستثمر،وتكاليف تطهير التلوث والتحكم فيه، ويجب تحليل كل حالة على حدة،لأنه لا يوجد حل شامل للمشاكل الموجودة فى الإنتاج الميكروبى للمواد الكيميائية.

تخليق البروتينات الغريبة من كائنات مجهرية

Synthesis of foreign proteins by microorganisms

يمكن تخليق بروتينات غريبة عديدة حالياً بواسطة الكائنات المجهريـــة،التى تشمل البكتيريا والخميـــرة(شـــكل ٥-٦)،كنتيجـــة لتكنولوجيـــا الـــــــــ د.ن.أ المطعم(جدول٥-٩ والفصل الرابع)، ولهـــذا التخليـــق عـــدد مـــن المميـــزات، فالبروتينات التى كان يندر وجودها من قبل ، مثل هرمـــون النمـــو البشـــرى والإنترفيرونات،أصبحت متوفرة حالياً بكميـــات كبيـــرة مـــن أجـــل الدراســـة

والاستخدام العلاجى، ومع ذلك، فلا يزال هناك عدد من المشاكل فى حاجة إلى حلول.



شكل ٥-٦ صورة مصغرة للفطر السكرى(الخمائر أحادية الخلية)Saccharomyces، استخدم هـذا الفطـر فـى صنع الخبز والبيرة، وفى تطبيق أخير ،استخدم هذا الكائن العضوى كعائل مهندس وراثيًا لتصنيع البروتينات الغريبة،التى تشمل، الإنترليوكين-٢ البشرى، وقد اختبر هذا البروتين إكلينيكيًا لعلاج السرطان والإيدز.

جدول ٥-٩ إنتاج البروتينات الغريبة من كائنات مجهرية

Proteins	Microorganisms
Aspergillus glucoamylasc	*Saccharomyces cerevisiae*
Bacillus subtilis cnao-beta-l ,٣,	*Escherichia coli*
-١ ,٤-glucanase	*Saccharomyces cerevisiae*
Bacillus subtilis penicilhinase	*Escherichia coli*
Bovine growth hormonc	*Escherichia coli*
Calf prochymosin	*Escherichia coli*
	Saccharomyces cerevisiae
Cellulomonasfimi cellu.lase	*Escherichia coli*
Beta.cndorphin	*Saccharomyces cerevisiae*
Erwinia chysanthemi pectinases	*Escherichia coli*
Escherichia coli beta-galactosidase	*Saccharomyces cerevisiae*
Growth hormone relcasing factor	*Saccharomyces cerevisiae*
Hcpatitis B surface antigen	*Saccharomyces cerevisiae*
Human epidcrmal growth factor	*Saccharomyces cerevisiae*
Human growth hormone	*Escherichia coli*
Human immunoglobulin E chain	*Escherichia coli*
Human alpha-interferon	*Bacillus subtilis*
	Escherichia coli
Human beta-interfcron	*Escherichia coli*
Human gamma-interferon	*Eschet-ichia coli*
Human interleukin-٢	*Escherichia coli*
	Saccharomyces cerevisae
Human proinsulin	*Bacillus subtilis*
Human tumour ncerosis factor	*Escherichia coli*
Insulin-like growth factor I and II	*Saccharomyces cerevisiae*
Invertase	*Saccharomyces cerevisiae*
Mousc immunoglobulin E	*Saccharomyces cerevisiae*
Mouse interleukin-٢	*Escherichia coli*
	Saccharomyces cerevisiae
Mouse interlcukin-٣	*Saccharomyces cerevisiae*
Rat protnsuhn	*Escherichia coli*
Semliki Forest virus protein El	*Bacillus subtilis*
Sen-atia narcescens nuclease	*Escherichia coli*
Staphylococcus aureus protein A	*Bacillus subtilis*
Staphylococcus aureus nuclease	*Bacillus subtilis*
Streptococcus equisimilis Streptokinase	*Escherichia coli*
The t-momonospora cellulase	*Escherichia coli*
Wheat alpha-amylase	*S~zccharomyces cerevisiae*

والعديد من البروتينات الغريبة التى تنتجها الكائنات المجهرية جزيئات هشة، وبالإضافة إلى ذلك،فقد تكون جزيئات الـــ د.ن.أ المطعمة غير ثابتة وراثياً،وغالبا ما تحتاج إلى معالجات وراثية لتصحيح التغيرات التى تطرأ عليها، ونتيجة لذلك،يجب اختبار وضمان سلامة البروتينات المنتجة بواسطة الميكروبات،خصوصًا إذا كان الغرض منها أن تستخدم فى علاج المرضى من البشر، والقوانين الحكومية، يستهدف العديد منها منتجات الـــ د.ن.أ المطعم،وتشكل عبئا إضافياً على الشركات التى تصنع هذه المنتجات.

وستكون آخر أعاجيب التخليق الحيوى من الكائنات الحيوية المتغيرة وراثياً من الآن فصاعدا ، ولا تقتصر التكنولوجيات الجديدة على إنتاج البروتينات التى أوجدتها الطبيعة، فالطرق الكيميائية والوراثية متاحة من أجل إنشاء أنواع جديدة من البروتينات على أمل تحسين خصائصها، وقد تم هذا بالفعل بالنسبة لإنزيم الـــsubtilisin ،على سبيل المثال، وابتكرت دراسات هندسة البروتين فى مؤسسة جينيكسGenex Corporation فى روكفيل بولاية ميريلاند الثبات الحرارى للإنزيم،فى حين قام الباحثون فىGenencor فى جنوب سان فرانسيسكو بتخليقsubtilisins طافرة،بمقاومة تبييض مرتفعة وكفاءة حفزية.

وفى تلك الأثناء،أثار إنتاج البروتينات البشرية من الكائنات المجهرية سؤالاً مهماً يتعلق بالتأثيرات التى يمكن أن تسببها مواد كهذه، مثل هرمون النمو البشرى أو الإنترفيرون أو الانترليوكين على فسيولوجيا الكائن العضوى المنتج، وقد ينتج عن دراسة هذه التأثيرات بعض من الفهم العميق لشمولية الكيمياء الحيوية للكائنات الحية،من جانب،واستراتيجيات التطور،من جانب آخر .

تحويلات الستيرويد بواسطة كائنات مجهرية

Steroid transformations by microorganisms

تستخدم الكائنات المجهرية فى تعديل تركيبات مجموعة متنوعة من المـــواد، تشمل المضادات الحيوية،وأشباه القلويات، والهيدروكربونات الحلقية والطوليـــة، ومبيدات الآفات، والتربينات **terpenes**،والســتيرويدات، والعديــد مــن هــذه التفاعلات سيكون صعب ،إن لم يكن من المستحيل إنجازها بالطرق الكيميائيـــة القياسية.

أحد الاستخدامات البارزة للإمكانات الحفزية المحددة للخلايـــا والإنزيمـــات المثبتة ، هى فى تحويلات الستيرويد ذلك التطبيق الذى يختلف من حيث المفهوم عن معظم المفاهيم المذكورة من قبل، (فقد تعاملت الأمثلة السابقة إلى حد كبيـــر مع تخليق المواد الكيميائية التى تصنعها عادة كائنات مجهريـــة، مـــع اســـتثناء ملحوظ للبروتينات الغريبة التى تنتجها البكتيريا المهندسة وراثياً والميكروبـــات الأخرى) وتحويلات الستيرويد تعتبر أيضًا غريبة على الكائنـــات المجهريـــة ،والتى على الرغم من ذلك لها إنزيمات، يمكن أن تستخدم الستيرويدات كركائز.

وجميع الستيرويدات لها نفس التركيب النمطى المتكون من حلقة ذات خمس ذرات كربون، وثلاث حلقات كل منها ذات ست ذرات كربـــون، والمركبـــات الستيرويدية موزعة على نطاق واسع فى الطبيعة،إذ توجد فى كل من النباتـــات والحيوانات.

ويعتبر الكلسترول أحد الستيرويدات الأكثر أهمية فـــى الحيوانـــات، وعلـــى الرغم من أن هذا المركب له سمعة سيئة بصفة عامة، ويرجع ذلك أساســـاً لأن

استهلاك كميات كبيرة من الغذاء كان مرتبطاً بالخطر المتزايد من حدوث النوبات القلبية، وهو رغماً عن ذلك ، عنصر أساسى فى أغشية الخلية، ويعتبر أيضًا نقطة البداية لتخليق هرمونات ستيرويد الجسم، وتشمل هذه الهرمونات على هرمون الجنس الذكرى المسمى بالتستوستيرون**testosterone** ،وهرمونات الجنس الأنثوية الأوسترون **oestrogen** والبروجسترون**progesterone** ، وهرمونات القشرة الكظرية، المطلوبة من أجل تنظيم توازن الملح والماء، وأيض الجلوكوز، وملح الصفراء الرئيس**glycolate** ،الذى يعتبر ضرورياً لامتصاص الدهون الغذائية من الأمعاء الدقيقة.

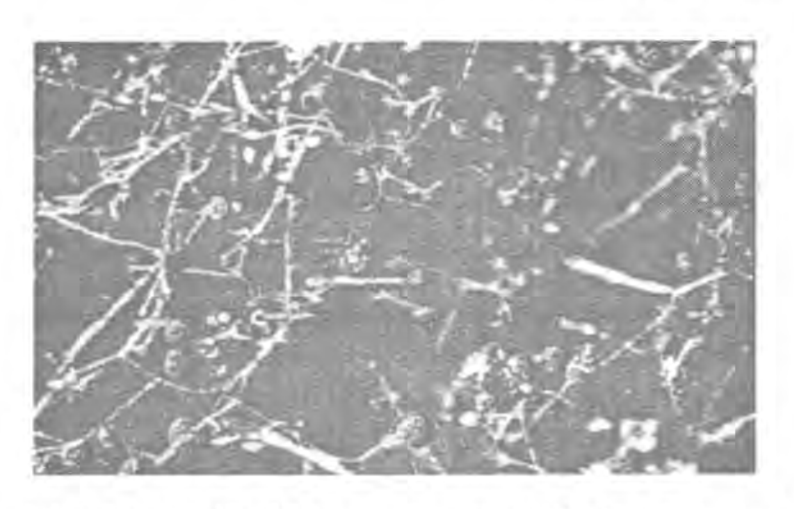
وقد ثبت فائدة العديد من الستيرويدات كعقاقير، فهى تستخدم لعلاج الأشخاص الذين يعانون من نقص فى الهرمون، بالإضافة إلى ذلك، فقد يعالج المرضى الذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية **autoimmune diseases**، أو الأشخاص الذين أجريت لهم زراعة أعضاء،قد يعالجون بالستيرويدات التى تبطل الاستجابات المناعية، وقد تستخدم العقاقير الستيرويدية أيضاً فى العلاج الكيميائى للسرطان. بيد أن الستيرويدات المستخدمة على نطاق واسع هى :الأوسترونات والبروجستيرونات التخليقية التى تعطى فى صورة حبوب لتنظيم النسل، ولم تصبح للعقاقير الستيرويدية هذا الانتشار الموجود حالياً، لولا تطوير طرق ميكروبية وكيميائية لتخليقها.

وغالباً ما تبدأ هذه التخليقات بالسترويدات النباتية، التى تعتبر رخيصة نسبياً ويسهل الحصول عليها. ومع بداية الخمسينات، ظهرت طرق كيميائية لتحويل الستيرويدات النباتية إلى بروجيسترون،وهو وسيط فى تحويل الجسم للكلوسترول

إلى هرمونات ستيرويدية عديدة، وفـــى الطـــرق الكيميائيـــة لإنتـــاج العقـــاقير الستيرويدية.

ويتطلب تخليق الستروبد غالباً الإضافة المحددة من مجموعـــة هدروكســـيل لواحدة من الــــ ١٧ ذرة كربون الموجودة فى الحلقة الستيرويدية للمركب الذى سيجرى التفاعل، وعلى سبيل المثال،فتحويـــل هرمـــون البروجســـترون إلـــى الهرمون القشرانى السكرى **glucocorticoids** ،الذى يحتوى علـــى هرمونـــات القشرة الكظرية**adrenal cortical hormones** ومشتقاتها،يتطلب إضافة مجموعة هيدروكسيل من كربون-١١ من البروجسترون.

ويعتبر من الصعب جداً القيام بإضافة مجموعة الهيدروكسيل بوسائل كيميائية دقيقة وكاملة، غير أنه فـــى عـــام ١٩٥٠،أوضـــح كـــلاً مـــن **H.C Murray** و**D.H.Peter** مـــن شـــركة**Upjohn** فـــى كلامـــازو بولايـــة ميتشـــيجان،أن الفطر **Rhizopus stolonifer** (شكل ٥-٧)،يمكن أن يقوم بدور الهيدروكســـيلية بكفاءة تجارية عالية.



شكل ٥-٧ صورة مصغرة لفطر من النوع الممرض R. stolonifer ، ويقوم هذا الفطـــر بتفاعـــل رئـــيس فـــى تخليـــق ســـتيرويدات عائلةglucocorticoid،التى قد تستخدم فى إخماد أجهزة المناعة للمرضى الذين أجروا زراعة أعضاء،ومن أجل علاج السرطان.

ومنذ ذلك الحين تم التعرف على الكائنات المجهرية التى يمكنها أن تضـيف مجموعات الهيدروكسيل بصورة محددة لكل الكربونات الموجـودة فـى حلقـة الستيرويد تقريباً، وقد حققت بعض من هذه التحولات منفعة صـناعية، وتظـل عملية الهيدروكسيلية الميكروبية للسترويدات واحدة من أفضل الأمثلـة لتفـوق الحفز البيولوجى على الحفز الكيميائى، وبالإضافة إلـى هيدروكسـيلية حلقـة الستيرويد، يمكن أن تؤثر الميكروبات على التحولات الأخـرى للسـتيرويدات ،التى تشمل على إزالة ذرات هيدروجين من ذرات كربونية معينة، وعلى سبيل المثال،فالتحول التجارى للـ **cortexolone** إلى **prednisolone** ، الذى يستخدم كعقار مضاد للالتهاب،يشمل أولاً على تفاعل هيدروكسيلى وبعـد ذلـك يـزال الهيدروجين،وتقوم بإجراء تلك العمليتين الكائنات المجهرية.

تأثير تكوين الركيزة والبيئة علي تركيب المواد الكيميائية التـــي تنتجهـــا كائنات مجهرية

Effects of substrate composition and environment on the structure of chemicals produced by microorganisms

يمكن التوسع فى القدرات التخليقية الطبيعية للكائنات المجهرية والتى تعتبر قـــدرات كبـــــيرة بالفعـــل ، من خــلال استخـــدام حـــالات تنحـــرف عـــن الحـــــالات التى تواجـــه الميكروب عادة ، ويتم هذا أحيانًا عن طريق تغييـــر مكونات الركيزة التى ينمو عليها الكـــائن المجهـــرى ، والمثـــال البـــارز على ذلك ، إنـــتاج استرات الشمع من بكـــتيريا Acinetobacter sp. Ho ١ - N .

وتتكون استرات الشمع من أحماض دهنية طويلـــة السلســـلة وكحوليـــات مرتبطة برباط من الإستر (ملح الكحول) ، وقد أوضحت الدراسات التى قـــام بها J. Geiger من شركة سيتوس فى إيمرفيل بولاية كاليفورنيا ، أنـــه عنـــدما تنمو البكتريا Acinetobacter sp. Ho ١ - N علـــى ركيـــزة بســـيطة مـــن straight - chain hydrocarbon hexadecane ، التى توجـــد بهـــــا ١٦ ذرة كربون، فإن إسترات الشمع الرئيسية يحتـــوى كـــل منهـــا علـــى ٣٢ ذرة كـــربون ، وذلك لأن الكحوليات والأحـــــماض التى ينتجهـــا البكتـــــير مـــن الهكساديسين ، تحتوى جميعها علـــى ١٦ ذرة كربون ، والإسترات المتكونة من ارتباط الكحوليات والأحمـــاض ذات الـــ ١٦ ذرة كربون ، فلابد وأن تحتـــوى على ٣٢ ذرة كربون .

CH٣ (CH٢) ١٤ CH٣Ch٣ (CH٢)   CO٢ H + (HO)١٥(CH ٣

Haexadecane   Hexadecanoid   Hexadecanol

= CH ٣ (CH١٤) CO (CH٢) CH ٣ [C - ٣٢ Wax ester]

وبطريقة مشابهة،فعند تربية البكتير علـــى أوكتاديســـين،الذى لـــه ١٨ ذرة كربون،سوف يؤدى إلى إنتاج استرات الشمع ذات الــــ٣٢ ذرة كربـــون، وإذا كانت الركيزة هى الأيكوسين **eicosane** المتكونة مـــن سلســـلة متصـــلة مـــن الهيدروكربون ذى الــــ ٢٠ ذرة كربون،فسوف تكـــون النتيجـــة خلـــيط مـــن الإسترات، على الأخص تلك الإسترات المحتوية على٤٠و٣٨و٣٦ ذرة كربون، وهذا يحدث لأن الهيدروكربون المحتوى على ٢٠ ذرة كربون يتحول إلى بشائر استرية ذات ٢٠و١٨ ذرة كربـــون، وأخيـــراً، إذا اســـتخدم هيـــدروكربون ذو الــــ٢٢ ذرة كربون،والمسمى بـــــدوكوسان كركيزة للبكتير **Acinetobacter sp. Ho١-N**،فسوف تحتوى إسترات الشـــمع الرئيســـة علـــى ٤٤و٤٢و٤٠ ذرة كربون.

ويهتم الباحثون بتغيير طول سلسلة استرات الشمع التـــى ينتجهـــا البكتيـــر **Acinetobacter** ،حيث يعطى الكائن العضوى بدائل اقتصادية لاسترات الشمع الموجودة فى بعض الزيوت الطبيعية، بما فيها الاسترات التى تحمى جزئياً زيت عنبر الحوت،والأسماك البرتقالية الشرسة، ونبات**jojoba**، وهذه الزيوت التـــى لكل منها تكوين مختلف (جدول٥-١٠)،تستخدم كشـــحوم،أما بالنســـبة لزيـــت نبـــات**jojoba** فيســـتخدم فـــى مستحضـــرات الجميـــل، وأظهـــر البحـــث مع**Acinetobacter** إن اختيار الركيزة المناسبة،يمكن أن تساعد البكتيـــر علـــى إنتاج زيوت ذات تكوينات تشابه تكوينات الكائنات العضوية المعقدة(مثل زيت عنبر الحوت).

وهناك طريقة ثانية وأكثر براعة لتغيير طول السلسلة الكربونيـــة لإســـترات الشمع،هى من خلال تربية كائن عضوى على حمض البروبيونيك،الذى به ثلاث ذرات كربون، والمادة الرئيسة البادئة فى تخليق الأحماض الدهنية والكحوليـــات

ذات السلسلة الطويلة هى الحمض ذو الذرتين كربـــون،حمض الخليـــك **acetic acid .**

ولما كانت الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون أساساً مـــن وحـــدات ذات ذرتين كربون،فإنها هى وأملاحها،لها أعداد زوجية من ذرات الكربونات، ولكن عندما يستخدم حمض البروبيونيك كركيـــزة لبكتيـــر **Acinetobacter sp. Ho١-N**،فإن الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون من وحدات من ٣ ذرات كربـــون وأيضاً ذرتين كربون،وبالتالى تؤدى إلى إنتاج إســترات الشـــمع ذات الأعـــداد الفردية والزوجية من ذرات الكربون.

جدول (٥- ١٠). توزيع إسترات الشمع الرئيسة من عدة مصادر بيولوجية

Source	No. of carbon atoms m wax esters										
	٢٨	٣٠	٣٢	٣٣	٣٤	٣٥	٣٦	٣٨	٤٠	٤٢	٤٤
Orange roughv					+		+	M[a]	+	+	
Spermwhale	+	+	M		+		+				
Jojoba bcan								+	+	M	+
Acinetobacter	H٠١-N										
N-Hexadecane			M								
N-Octadecane					+		M				
N-Eicosane							+	M	+		
N-Docosane									+		+
Acetic acid			+		M		+				
Ethanol			+		M		+				
Propionic acid			+	+	M	+	+				
Propanol			+	+	M	+	+				

“M, main ester.

والطريقة الثانية والأكثر دقة لتغيير طول سلسلة الإسترات الشمعية،تتم عـــن طريق تربية كائن عضوى على حمض البروبيونيك،الـــذى لـــه ثـــلاث ذرات كربون، والمادة الرئيسة البادئة فى تخليق الأحماض الدهنية والكحوليـــات ذات السلسلة الطويلة هى الحمـــض ذو الـــذرتان كربـــون،حمض الخليـــك **acetic acid**.ولما كانت الأحماض الدهنية والكحوليات تتكون أساساً من وحـــدات ذات

ذرتين كربون ، فإنها هى وأملاحها ، لها أعداد زوجية من ذرات الكربونـــات ، ولكن عندما يســـتخدم حمـــض البروبيونيك كمـــادة تفاعل مع البكـــتير Acinetobacter sp Ho١-N فإن الأحمـــاض الدهنية والكحوليات تتكـــون من وحدات من ٣ ذرات كربون وأيضًا ذرتيى كربون ، وبالتالى تـــؤدى إلـــى إنتاج إسترات الشمع بكل أعداد فردية وزوجية من ذرات الكربون .

ويمكـــن أن يغير أيضًا اختلاف درجة الحرارة التركيب الكيميائى لإسترات شمع الــ Acinetobacter ، وتوجد فى الطبيعة علاقة مشتركة وعكسية بين درجة الحرارة وعدد الروابط الزوجية فى الليبيدات ، مثل الأحماض الدهنيـــة ، وعندما يحتفظ بكائن عضـــوى مثـــل Acinetobacter فـــى درجـــات حـــرارة عاليـــة تكـــون الليبـــيدات التى ينتجها « مشبعة » إلى حد كبير والذى يعنى أنها لا تحتوى على روابط زوجية .

والأحماض الدهنية ذات السلاسل الطويلة ، تعتبر مركبـــات بـــارزة مـــن ليبيدات أغشية الخلية ، وتنصهر الليبيدات غير المشبعة فى درجات حرارة أقل من الليبيدات المشبعـــة ، ونتيجـــة لذلك ، فالتـــغير فى تشبع الليبيد الذى يحدث عند تتغير درجة الحرارة ، يساعد على الاحتفاظ بسيولة الليبيد وعلـــى وظيفـــة الغشاء ، ويمكن أن يكون التغيير فى تكوين الليبيد تغيرًا جوهريًا ، فمن خـــلال تقليل درجة الحرارة من ٣٠ درجة مئوية إلى ١٧ درجة مئوية ، ينتج عنه زيادة فى نسبة إسترات الشمع مع اثنان من الروابط المزدوجة ، التى تنتجها مـــن ٩ إلى ٧٢ فى المائة ، فى حين تتـــناقص نسبة إسترات الشمع المشبعة مـــن ٦٦ إلى ١٠ فى المائة .

---

(١) ومع ذلك عندما تنخفض درجة الحرارة تصبح الليبيدات غير مشبعة بشكل متزايد ؛ أى أن عدد الروابط الزوجية يتزايد .

المستقبل

سيظل تحقيق الإمكانات الكاملة من الإنتاج الميكروبى للمواد الكيميائية الحيوية مدخراً للمستقبل. وسوف تتطلب العديد من التفاعلات الميكروبية التى ذكرت فى هذا الفصل تحسينات ، فقد ظهرت بشائرها التجارية،ولكن لا يزال هناك المزيد.

وسوف تمتد التحسينات المطلوبة لكل مرحلة من مراحل العمليات الميكروبية، ويجب أن تحدد ظروف أفضل لتربية الكائنات العضوية،ويجب أن تكون طرق تثبيت سواء الميكروبات أو الإنزيمات التى تنتجها أكثر فاعلية ، وسوف تكون أيضاً مطلوبة الطرق الأكثر اقتصادية لإنتاج المواد الأولية الكيميائية من أجل التفاعلات.

وتصميم أجهزة التفاعل الحيوية،يعتبر هدفاً آخر من أهداف التحسين. فسوف يتيح هذا التصميم الجيد اتصالاً أفضل بين الحافز الحيوى المثبت والمواد الكيميائية الأولية، وسوف يساعد البحث عن ظروف أكثر تلاءماً للمفاعل الحيوى على زيادة غلات المنتج مثلما تساعد الطرق الأفضل فى فصل المنتج عن المنتجات الثانوية والمخلفات، وعلى وجه الخصوص،تحتاج طرق عزل المنتجات من المحاليل المخففة إلى أن تتم بطريقة فعالة، وأخيراً،يجب أن تتم عملية إعادة تدوير الركائز غير المستخدمة والتخلص من المخلفات فى عملية واحدة.

وسوف تصبح الكائنات المجهرية نفسها أهدافاً لأبحاث كثيرة، وسيشمل ذلك الجهود لتحسين الكائنات المجهرية المستخدمة حالياً،ويحتمل أن يتم ذلك عن

طريق الهندسة الوراثية بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم،والتعرف علـــى ميكروبات جديدة من أجل التطور التجارى، فالسلالات الميكروبية التـــى تنـــتج منتجاتها بكفاءة،ويمكن أيضاً أن تقاوم الضغوط البيئيـــة مثل،ارتفـــاع درجـــات الحرارة وتركيزات الأملاح، والتغيرات فـــى الأس الهيـــدروجينى والتعـــرض للمذيبات،تعتبر من السلالات التى سيزداد الطلب عليها ، وبمجرد التعرف على مثل هذه السلالات من الكائنات المجهرية،فسوف تجد المشاكل الناجمـــة عـــن زيادة الحجوم من المقادير المعملية إلى المقادير التجارية طريقها للحل.

وتتنوع هذه المشاكل تتنوع من عملية لأخرى،وغالباً ما يتطلب التغلب عليها قدراً كبيرًا من الذكاء والبراعة.

وأخيراً ، فقد يقود البحث إلى استبدال التفاعلات الكيميائية بأخرى حيويـــة، وكان اليابانيون نشطين جداً فى هذا المضمار، فالإنتاج العلمى اليابانى يحتـــوى على العديد من التقارير التى تظهر جهداً علمياً نشطاً فـــى اســـتخدام الطـــرق الميكروبية فى صنع سلسلة متنوعة من المركبات،التى تحتوى على الكحوليـــات والأحماض الدهنية والسكريات،التى تجرى حالياً بالطرق الكيميائية.

وقد أظهرت الكائنات المجهرية بالفعل تباشيرها فى هذا المجال،وسوف تكون إمكاناتها فى المستقبل هائلة، وسيقع على كاهل رجال التكنولوجيا الحيوية،تحويل هذا الحلم إلى حقيقة.

الفصل السادس

بروتينـــات من كائنـــات وحيـــدة الخليـــة

Single-Cell Proteins

بروتينيات الكائنات وحيدة الخلية،هى خلايا مجففة لكائنات مجهرية، مثـل الطحالب والبكتيريا والخمائر والفطريات الصغيرة والفطريات الراقيـة ، التـى تربى فى نظم استزراع ضخمة لاستخدامها كبروتينيات للاستهلاك الآدمـى أو الحيوانى، وتحتوى المنتجات مواد غذائية أخرى،تشمل المواد الكربوهيدراتيـة، والدهون،والفيتامينات، و المعادن.

ولا يعتبر استهلاك الكائنات المجهرية كجزء من الوجبة الغذائية البشرية حدثاً جديداً(جداول ٦-١ إلى ٦-٣) ،فقد تناولها الناس فى غذائهم بصورة أو بأخرى منذ عصور سحيقة ، وعلى سبيل المثال، تعتبر خلايا الخميـرة عنصـر مـن عناصر اختمار الخبز، وتوجد بكتيريا حمض اللبن فى الجبن والألبان المخمـرة كالزبادى والمقانق (السجق) المخمر،والفطريات هى العوامل المسـتخدمة فـى تحضير فول الصويا الشرقية المخمرة ومنتجات الأسـماك ، وزرع الأزتيـك١ القدماء الذين عاشوا فى المكسيك طحالب من جنس Spirulina فى البرك القلوية، وتناولوها فى وجباتهم الغذائية، ولا يزال يأكل سكان إقليم بحيرة تشاد فى أفريقيا الـــ Spirulina المجففة حتى فى وقتنا الحاضر.

نشأت التكنولوجيا الحديثة لإنتاج البروتين من كائنات وحيـدة الخليـة فـى بريطانيا العظمى عام ١٨٧٩، مع استحداث القدور المـزودة بـالهواء لإنتـاج خميـرة الخبـز الفطريّـة السـكريّة الجعويّـة(Saccharomyces cerevisiae)،

واستخدمت النابذة٢ لأول مرة فى الولايات المتحدة عام ١٩٠٠ تقريباً لفصل خلايا خميرة الخبز عن الوسط الذى تنمو فيه.

جدول ٦-١ التطورات التى طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية منذ العصور القديمة حتى عام ١٩٠٠

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
عام ٢٥٠٠ قبل الميلاد	الفطيرة السكرية الجعوية	استخلاص خلاصة خميرة التخمير للخبز
١٧٨١-١٧٨٢	الفطيرة السكرية الجعوية	تحضير الخميرة المضغوطة من خميرة البيرة(المملكة المتحدة،هولندا، وألمانيا
١٨٦٠	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية فيينا الهوائية، ركيزة الحبوب المجروشة المنقوعة (النمسا)
١٨٦٨	الفطيرة السكرية الجعوية	إدخال تصنيع الخميرة المضغوطة فى الولايات المتحدة(فلايشمان)
١٨٧٩	الفطيرة السكرية الجعوية	التهوية المستمرة (المملكة المتحدة)
١٩٠٠	الفطيرة السكرية الجعوية	استخدام النابذ لفصل الخميرة(الولايات المتحدة)

جدول ٦-٢ التطورات التى طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية فى الفترة من عام ١٩٠٠ - ١٩٤٥.

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
١٩١٤-١٩١٨	الفطيرة السكرية الجعوية	تغذية متزايدة، مولاس،أملاح أمنيوم(ألمانيا)
١٩١٨-١٩١٩	Endomyces (فطر) vernalis	إنتاج الدهون من سائل الكبريتيت(ألمانيا)
١٩٢٠	الرشاشيات الدخناء	النمو على القش والنتروجين غير العضوى لتحضير علف الماشية(ألمانيا)
١٩٣٦	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية هلسنكى القديمة لاستخدام سائل الكبريتيت(فنلندا،ألمانيا)
١٩٣٦	الفطيرة السكرية الجعوية	عملية سكولر-تورنسك لإنتاج خميرة علف الماشية من سكر الخشب(ألمانيا)
١٩٤١-١٩٤٥	Candida utuilis (فطر)	إنتاج خميرة الطعام من سائل الكبريتيت وسكر الخشب(ألمانيا)
	Geotrichum candidum (Oidium lactis)، فطر	إنتاج الدهون (ألمانيا)

جدول ٦-٣ التطورات التى طرأت على إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية منذ عام ١٩٤٥ وحتى وقتنا الحاضر.

الفترة	الكائن العضوى	التطور التكنولوجى
١٩٤٥-١٩٥٤	Candida utilis	تشغيل مستمر للخميرة من سائل الكبريتيت-مخمرات ووالدهوف(الولايات المتحدة)
١٩٤٨-١٩٥٣	Chlorella sP.	إنتاج الطحالب بنظم الدورات المفتوحة(اليابان)
١٩٥٩	Saccharomyces cervisiae	الإنتاج المستمر من خميرة الخبز على المستوى التجارى(انجلترا)
١٩٥٤-١٩٦٣	Morchella sP.	المزارع المغمورة من أفطورة عش الغراب(الولايات المتحدة)
١٩٥٨-١٩٦٤	Kluyveromyces fragilis	إنتاج خميرة فارجليس للطعام من شرش الجبن(الولايات المتحدة)
١٩٥٧-١٩٧٢	C.lipolytica,C.tro -picalis	إنتاج الخميرة من الهيدروكربونات، paraffins،n-زيوت الغاز فى مخمرات الهواء الصاعد(المملكة المتحدة وفرنسا واليابان وروسيا)
١٩٦٣-١٩٧٤	Fungi	إنتاج الفطريات من سائل الكبيرتيت المستهلك،عملية بكليو(فنلندا)
١٩٧٠-١٩٧٤	C.utilis	إنتاج خميرة الطعام من الإيثانول(الولايات المتحدة)
١٩٧١-١٩٧٥	K. fragilis	الإنتاج المستمر من خميرة فارجليس والإيثانول أومن الإيثانول من شرش الجبن
١٩٧٩-١٩٨٠	Methylophilus methylotrophus	الإنتاج البكتيرى المستمر للبروتين من كائنات وحيدة الخلية من الميثانول على نطاق تجارى(المملكة المتحدة)
١٩٨٣-١٩٨٥	C.utilis,K.fragilis, S.cerevisiae	كثافة خلوية عالية، عملية تجفيف مباشر لإنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية من الإيثانول والكربوهيدرات(الولايات المتحدة)

كانت خميرة الخبز تنتج فى ألمانيا خلال الحرب العالمية الأولى للاستهلاك الآدمى فى صورة إضافة بروتينية، واستخدم المولاس كمصدر للكربون والطاقة لاستزراع الخميرة،واستخدمت أملاح الأمونيوم كمصدر للنتروجين، ثم استزرعت ألمانيا خلال الحرب العالمية الثانية خميرة من جنس الفطور الخمرية الـ Candida utilis كمصدر بروتينى للاستهلاك الآدمى والحيوانى، وكانت المادة التى ينمو عليها هذا الفطر هى مخلفات سائل الكبريتيت الناتج عن تصنيع الورق واللباب وسكر الخشب، الذى كان يتم الحصول عليه من الانحلال الحمضى للخشب.

وفى السنوات الأخيرة، أدت التطورات التى حدثت فى المعرفة العلمية بفسيولوجيا وتغذية ووراثة الكائنات المجهرية إلى تحسينات مهمة فى إنتاج البروتين من سلسلة كبيرة من الكائنات وحيدة الخلية والمواد التى تنمو عليها، وعلى سبيل المثال،يمكن إنتاج البكتيريا التى تحتوى على نسبة من البروتين-٧٢% أو أكثر- بصورة مستمرة من الميثانول كمادة خام،ويمكن أن تنمو خمائر تستخدم كغذاء بتركيزات خلوية عالية لتقليل تكاليف الطاقة المستخدمة فى تجفيف الخلايا.

واستخدمت كل من الكائنات المجهرية التى تستمد أولاً تستمد طاقتها من التمثيل الضوئى فى إنتاج بروتين الكائنات وحيد الخلية، وتتطلب هذه الكائنات،كحد أدنى بيئة مائية لكى تنمو ،ومصدر كربون وطاقة ومصدر نتروجين وتوفر عناصر غذائية أخرى،تشمل الفسفور والكبريت والحديد والكالسيوم والمغنسيوم والمنجنيز والصوديوم والبوتاسيوم والعناصر الصغرى، ولا تستطيع بعض الكائنات العضوية أن تصنع الأحماض العضوية والفيتامينات والمكونات الخلوية الأخرى من مصادر كربونية ونتروجينية بسيطة،وفى هذه الحالة،يجب أن توفر هذه المواد للكائن العضوى لكى ينمو عليها .

استخدام الكائنات العضوية المخلقة ضوئياً لإنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية

Photosynthetic organisms in single-cell protein production

تعتبر الطحالب والبكتيريا من بين الكائنات المجهرية المخلقة ضوئياً ،التى تستغل فى إنتاج البروتين من وحيدات الخليه. فالنمو المخلق ضوئيا للطحالب

المفيدة،التى تشمل أنواع Chlorella و Scenedesmus و Spirulina (جدول ٦-٤) يمكن تمثيلها كما يلى:

ثانى أكسيد كربون + ماء + أمونيا أو نترات + معادن (مصدر نتروجين) ← طاقة ضوئية — خلايا طحلبية (بروتين وحيد الخلية) + أكسجين

يصل تركيز ثانى أكسيد الكربون الموجود بالجو حوالى ٠,٠٣%،والـــذى لا يعتبر كافياً كى يساعد على نمو الطحالب بالمعدلات المطلوبة لإنتاج البـــروتين من وحيدات الخلية، ويمكن إضافة مقادير من ثانى أكسيد الكربـــون بواســـطة الكربونات أو البيكربونات الموجودة فى البرك القلوية عـــن طريـــق الغـــازات الناتجة أثناء الاحتراق أو من تحلل المادة العضوية فى مخلفات الصرف الصحى والصناعى، وعلى سبيل المثال،يتراوح تركيز ثانى أكسيد الكربون فى غـــازات الاحتراق ما بين ٠,٥% إلى ٥%.

جدول ٦-٤ عمليات مختارة لتصنيع البروتين من طحالب وحيدة الخلية.

الكائن العضوى	المادة الخام	الإنتاج	الجهة المنتجة أو المطورة
Chlorella sP.	ثانى أكسيد الكربون (من التخليق الضوئى)،شراب القصب،المولاس(من التخليق غير الضوئى)	٢طن مترى/يوم	الشركة التايوانية لتصنيع الكلوريللا المحدودة ، تايبى ، تايوان.
Scenedesmus Acutus	ثانى أكسيد كربون،يوريا(التخليق الضوئى)	٢٠جم/م٢/يوم	معهد الأبحاث التكنولوجى المركزى للأغذية ميسور،الهند
Spirulina maxima	ك أ٢،لو ص يد ك أ٣-ص ٢ ك أ ٣	٣٢٠طن مترى/سنة	سوسا تكسكوسا مكسيكيو سيتى.

وتشمل مصادر النتروجين لإنتاج الطحالـــب أمـــلاح الأمونيـــا أو النتـــرات أو النتروجين العضوى الموجود فى برك أكسدة الصرف الصحى، وعادة ما توجد

المواد الغذائية الفسفورية والمعدنية الأخرى فى المياه الطبيعية ومياه الصرف الصحى بتركيزات كافية لنمو الطحالب، وتعتبر مشكلة "الإزهار" الطحلبي algal bloom التى تحدث فى أواسط فصل الصيف فى العديد من الخزانات،دليلاً واضحًا على كفاية تركيزات هذه المواد الغذائية.

شدة الضوء ودرجة الحرارة من العوامل المهمة لنمو الطحالب. فاستخدام الضوء الصناعى يعتبر مكلفاً جداً لإنتاج البروتينات من وحيدة الخلية كمادة غذائية للحيوان، ولكى يكون استزراع مقادير كبيرة من الكائنات المجهرية مجدى اقتصادياً حينئذ، يجب أن تكون السماوات صافية نسبياً فى مواقع الاستزراع ،كما يجب أن تكون هناك التغييرات فى شدة الضوء طفيفة خلال العام، بالإضافة إلى ذلك،يجب ألا تقل درجة الحرارة عن ٢٠ °مئوية فى معظم أيام السنة، وبناء على ذلك،تعتبر البرك الصناعية فى المناطق المدارية وشبه المدارية أو الجافة من المناطق النموذجية لتربية الطحالب، وتشمل المواد المستخدمة فى بناء البرك الصناعية: الخرسانة واللدائن أو رقائق الألياف الزجاجية.

ويتطلب استزراع الطحالب برك ذات مساحات كبيرة،وتنمو الطحالب فوق الـ ٢٠ أو الـ ٣٠ سم العليا من سطح البركة،حيث تكون شدة الضوء عالية، وغالباً ما تقلب مياه البرك،إما بصورة مستمرة أو بصورة متقطعة بواسطة الطلمبات أو العجلات المجدافية أو الطواحين الهوائية،لمنع الطحالب من الرسوب فى قاع البركة، ويضمن هذا التقليب تعرض الخلايا والمادة الغذائية للضوء بانتظام.

تربى الطحالب بصفة عامة فى ظروف استزراع مختلطة غيــر معقمـــة،فى أماكن تفضل فيها الظروف البيئية تسيد الأنواع الطحلبية المرغوبة على الأنواع المنافسة، ففى المكسيك، أنتج الطحلب الأزرق-الأخضر مــن نـــوع Spirulina maxima كمرحلة تجريبية فى المياه القلوية الطبيعية لبحيــرة تكســكوكو،والتى يتــراوح فيهـــا الأس الهيـــدروجينى مـــا بـــين ٩إلـــي١٠، وتطفـــو خلايـــا السبريوليناSpirulina على السطح فى صورة كتل طحلبيـــة ويجـــرى جمعهـــا. وأنتجت وحدة تجريبية فى هذا الموقع طناً واحداً فى اليوم من البـــروتين مـــن الطحالب وحيدة الخلية وطرح للبيع كغذاء صحى.

ويجرى تربية السبريولينا أيضًا بكميات تجارية صغيرة فى جـــزر هـــاواى وتايلاند وإسرائيل وتايوان، ففى هاواى تستخدم شـــركة كيانوتيـــك Cynotech بركتين لإنتاج ما يقرب من ٦٢٥كجم من المنتج الجاف شهرياً لبيعه فى متاجر الأغذية الصحية بسعر ١٨ دولارا للكيلوجرام الواحد. وبيع منتج بهذا السعر هو بالقطع من أجل المستهلكين المترفين ولا يعتبر منتجاً شـــعبياً لإطعـــام ملايـــين المواطنين فى البلدان الفقيرة. وفى اليابان وتايوان،يجرى زارعـــة نـــوع مـــن طحالب كولوريللاChlorella بطريقتين،إما بالتخليق الضوئى فى البرك الصناعية المكشوفة،أو فى خزانات داخلية، ويستخدام شراب السكر أو المولاس كمصادر للكربون، وتباع الطحالب المجففة والطحالب المنتجة فى هذه البلدان فى صورة أقراص كأغذية صحية.

وتتعاون الحكومتان الهندية والألمانية فـــى مشـــروع الطحالـــب الهنـــدى-الألمانى،وقد أنشئ برنامج تعاونى فى المعهد التكنولوجى المركزى للأغذية فى مدينة مايسور بالهند لاستزراع الطحالب من جنس سكندسمسScendesmus فى

برك اصطناعية، وقد أقام هذا البرنامج مشروعات فى كل من مصـــر والهنـــد وبيرو وتايلاند، بالإضافة إلى ذلك، أظهرت الدراسات التى أجريت فى إسرائيل والأرجنتين،أن الطحالب المقاومة للأملاح من جنس دناليللاDunaliella يمكـــن زراعتها فى المياه الملحية لإنتاج بروتين من كائنـــات وحيـــدة الخليـــة،وإنتاج الجليسرول والبيتا-كاروتين كمنتجات مساوية لها فى الأهمية.

ويخدم زراعة الطحالب على مخلفات الصرف الصحى هدف مزدوج،فهـــى تنظف البيئة من التلوث المحتمل وفى نفس الوقت تنتج بروتينات غذائية، وعلى سبيل المثال،أجرى الباحثون فى معهد التكنولوجيا فى حيفا بإسرائيل دراســـات مكثفة فى هذه المدينة على معالجة الصرف الصحى فى برك طحلبية وفى نفس الوقت إنتاج بروتين من خلايا وحيدة الخلية للعلف الحيوانى، وقـــد اتضـــح أن مدينة حيفا موقع مناسب لزراعة الطحالب لوجود شدة استضـــاءة عاليـــة مـــن الشمس على مدار العام.

وتتكون البرك هناك من قنوات ضحلة ملتوية مزودة بأجهزة لمزج وتهويـــة الطحالب، وتنمو المزرعة المختلطة من البكتيريا والطحالب فى البـــرك علـــى أنواع كثيرة من طحالب Chlorella وEuglena و Micractinium و Scendesmus. ويعتبر هذا نظاماً تكافلياً، حيث توفر الطحالب الأكسجين الـــذى تحتـــاج إليـــه البكتيريا.

وتشمل المزارع المكشوفة للطحالب لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية على إقران تكنولوجيا زراعية بميكروبولوجيا صناعية، ويعتمـــد هـــذان النظامـــان ويتقيدان بالمناخ وبتوفر الماء والضوء وثانى أكسيد الكربون والمواد الغذائيـــة، ويمكن أن يعملا بطريقة مثالية من خلال التحكم فى مورد ثانى أكسيد الكربـــون وانسياب السائل وتهوية النظام، وتصل إنتاجية النظام إلى مقـــدار يصـــل إلـــى

٣٥طناً مترياً من البروتين الطحلبى الجاف لكل هكتار (الهكتار=١٠٠٠٠متر مربع) من سطح البركة فى العام.

ولما كانت تركيزات الخلية الطحلبية فى سوائل المزرعة تتراوح ما بين جرام واحد إلى جرامين فقط من المادة الجافة لكل لتر،فيجب أن تعالج كميات المياه الكبيرة فى عمليات جمع الإنتاج، ويساعد ذلك بدرجة كبيرة على خفض تكاليف البروتينات من الطحالب وحيدة الخلية، ويجب أن تركز الخلايا بأية طريقة من الطرق المختلفة،التى تشمل: التعويم والترشيح والنبذ والتلبيد،ثم يتلوها عملية ترسيب،ثم تجفف المادة بعد ذلك فى مجففات أسطوانية، وعلى الرغم من أن التجفيف الحرارى فى المجففات الأسطوانية مكلفاً،فتعتبر هذه المعالجة الحرارية ضرورية للقضاء على الكائنات المجهرية التى يحتمل أن تسبب أمراض،وقد تلوث الطحالب التى تزرع فى برك معالجة الصرف الصحى.

وتشمل بكتيريا التخليق الضوئى المستخدمة لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية بكتريا من جنسRhodo-pseudomonas التى تم استزراعها على مخلفات الصرف الصحى والصناعى فى اليابان،لاستخدامها كعليقة حيوانية، وتنمو هذه البكتريا فى المزارع المختلطة على البكتيريا المثبتة للنتروجين والأنواع الأخرى الهوائية، ويجب أن يتوفر لها مواد عضوية، مثل مصادر الكربون والطاقة،ولا تنمو على ثانى أكسيد الكربون والضوء مثل الطحالب، وتبلغ كثافة المزرعة فى حدود جرام لجرامين من المادة الجافة لكل لتر،وفى هذا النظام أيضاً، توجد نفس المشاكل القائمة بالنسبة للطحالب مثل عمليات الفصل والتركيز .

الإنتاج غير المخلق ضوئياً من البروتين من وحيدات الخلية

The non-photosynthetic production of single-cell protein

تشمل الكائنات المجهرية غير المخلقة ضوئياً التى تربى من أجل الحصول على البروتينات من وحيدات الخلية البكتيريا وعفن الخبز والخمائر والفطور الأخرى، وهذه الكائنات العضوية كائنات هوائية، ويجب أن يتوفر لها الأكسجين حتى تنمو ، وتتطلب أيضاً مصدراً من الكربون والطاقة، بالإضافة إلى مصادر من عناصر النتروجين والفسفور والكبريت والمعادن،التى ذكرت من قبل كمصادر أساسية لنمو الطحالب.

ويمكن أن يمثل تحويل المركبات العضوية إلى بروتين من الكائنات المجهرية وحيدات الخلية غير المخلقة ضوئياً تبعاً للمعادلة التالية :

كربون عضوى + نتروجين + مادة غذائية معدنية + أكسجين ←

بروتين من وحيدات الخلية + ثانى أكسيد الكربون + ماء + حرارة

البكتيريا

The bacteria

اختبرت عدة أنواع من البكتيريا لاستخدامها فى إنتاج البروتين من وحيدات الخلية، ويعد النمو السريع من بين الخصائص التى تجعل البكتيريا ملائمة لهذا التطبيق. وتتكاثر هذه البكتيريا خلال فترات قصيرة، فيمكن لمعظمها أن يضاعف كتلته الخلوية فى مدة تتراوح ما بين عشرين دقيقة إلى ساعتين، والفترة المقارنة للخمائر فى حدود ثلاث ساعات،وبالنسبة لعفن الخبز والفطور يتراوح زمن التكاثر من أربع إلى ست عشرة ساعة .

ويمكن أن تنمو البكتيريا أيضاً على عدة أنواع مختلفة من المواد الخام التي تتراوح ما بين مواد كربوهيدراتية، مثل النشا والسكريات، إلى هيدروكربونات غازية وسائلة، مثل أجزاء الميثان والبترول، إلى بتروكيماويات، مثل الميثانول والإيثانول، وتشمل مصادر النتروجين المناسبة على الأمونيا وأملاح الأمنيوم واليوريا والنترات والنتروجين العضوى الموجود فى المخلفات، ويجب إضافة مادة غذائية معدنية إلى وسط المزرعة البكتيرية لكى تعطى المواد الغذائية التى قد تكون غير موجودة فى المياه الطبيعية تركيزات كافية لكى تساعد على النمو.

ويتحسن نمو الأنواع البكتيرية المحتمل استخدامها لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية فى أس هيدرجينى منخفض الحمضية إلى متعادل،ويتراوح ما بين ٥ إلى ٧ ، ويجب أن تستطيع البكتيريا أيضاً تحمل درجات الحرارة تتراوح ما بين ٣٥ ° إلي٤٥ ° مئوية،حيث تنبعث الحرارة أثناء النمو البكتيرى، واستخدام السلالات البكتيرية التى تتحمل درجات الحرارة، يقلل من الحاجة إلى تبريد المياه التى تبرد وعاء التخمر، ولا يمكن استخدام الأنواع البكتيرية لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية،إذا كانت تضر بالنبات والحيوانات أو البشر.

وقد يمكن إنتاج البروتين من وحيدات الخلية بواسطة نظم العبوة التقليدية،التى تضاف فيها المواد الغذائية أولاً إلى جهاز التخمر ويجرى حصاد الخلايا عندما تستهلك المواد الغذائية ويتوقف النمو، إلا أنه فى طرق الإنتاج المتطورة،يجرى إضافة المواد الغذائية بصورة مستمرة بالتركيزات المطلوبة للمساعدة على النمو البكتيرى،وتحصد الخلايا بصورة مستمرة بمجرد وصول كتلة الخلايا إلى التركيز المطلوب.

ويتراوح تركيز مصدر الطاقة والكربون ما بين ٢% إلى ١٠% في كل مرة من علميات العبوة، وبالنسبة لنظام العبوة المستمر،يجرى تنظيم إمداد مصدر الكربون،بحيث لا يزيد تركيزه في وسط النمو عن التركيز الذى يتطلبه نمو الخلايا البكتيرية.

هذا التركيز سيكون عموما أقل من التركيزات المستخدمة في عمليات العبوة,ومن الأمور المهمة جداً، الحفاظ على ظروف التعقيم أثناء إنتاج البروتين من وحيدات الخلية ،حيث تنمو الكائنات المجهرية الملوثة بشكل جيد في وسط المزرعة، ويجب تعقيم الهواء المستخدم والوسط الغذائى وجهاز التخمر المستخدم في كل عمليات إنتاج البروتين من الخلايا البكتيرية،وأن يحافظ على ظروف التعقيم خلال دورة الإنتاج.

ويظهر نظام الإنتاج المستمر للبروتين من البكتيريا بواسطة الميثانول كمصدر للكربون والطاقة سمات مشتركة مع معظم طرق الإنتاج (شكل ٦-١)، وبعد تعقيم المواد الغذائية يجرى إدخالها إلى وعاء التخمر وتلقم بالبكتيريا التى ستنمو عليها. ويجب أن يزود الوعاء المعروف بالمفاعل الحيويbioreactor بالهواء المعقم وبالماء المبرد لمنع تكون الحرارة المنبعثة أثناء التخمر وموت الخلايا، ويجرى تدوير الماء البارد،إما بواسطة قميص يحيط بجهاز التخمير من الخارج،أو بواسطة ملفات تبريد داخلية.

وتزود أوعية التخمر أيضاً بأجهزة لقياس وضبط الأس الهيدروجينى ودرجة حرارة المكونات وتركيز الأكسجين المذاب، ويحتوى الهواء المطرود من المفاعل الحيوى على غاز ثانى أكسيد الكربون،الذى يفصل ويضغط لكى يباع للمعامل الصناعية التى تستخدم الغاز.

وبعد إزالة البكتيريا من خزان التخمر يجب فصلها من حساء المزرعة، والذى يتم عادة بإضافة المواد الكيميائية التى تعمل على تجميع الخلايا ثم نبذها بالطرد المركزى، وتجفف الخلايا التى تم فصلها لتعطى منتجاً سيكون ثابتاً أثناء الشحن والتخزين، وأخيراً،يجب أن يوجد جهاز لطحن وتعبئة الخلايا،ونظام لمعالجة وتدوير سائل المزرعة المستهلك.

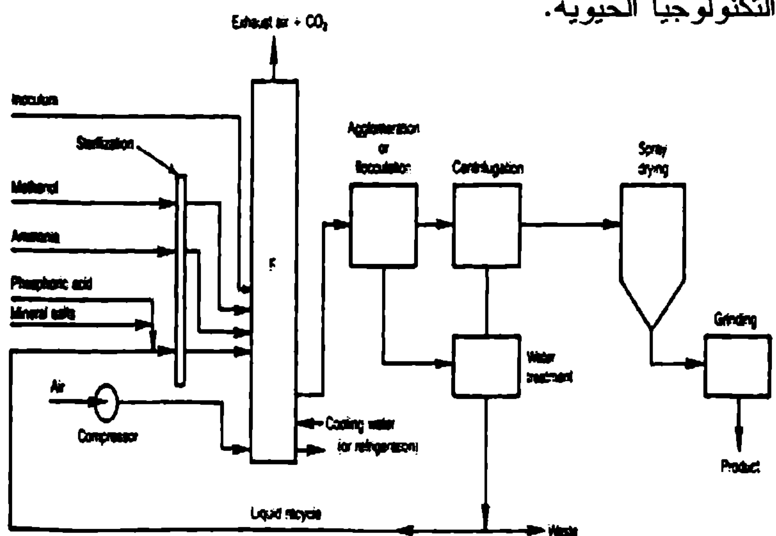
ويعتبر نقل الأكسجين إلى جهاز التخمر من العوامل المهمة جداً في الحصول على معدلات نمو وإنتاج مجدية اقتصادياً، ويمكن أن توفر تصميمات جهاز التخمر المختلفة التهوية الملائمة، ومن أكثر المفاعلات استخداماً هو baffled stirred-tank reactor(الخزان المزود بمصدات لتقليب مكوناته) (شكل ٦-٢) وجهاز التخمر air-lift fermentor (شكل ٦-٣).

وعلى الرغم من أنه أجريت أبحاث مهمة على إنتاج البروتين من البكتيريا وحيدة الخلية خلال فترة الستينات وأوائل السبعينات،فقد طورت الصناعات الكيميائية الإمبريالية(ICI) فى المملكة المتحدة العملية الفريدة للوصول إلى مستوى تجارى من العمليات، فقد استخدمت (ICI) فى عمليتها البكتير Methylophilus metylotrophus، الذى له دورة تكاثر حوالى ساعتين،وينمو بصورة مستمرة على الميثانول كركيزة وعلى مواد غذائية إضافية،تحتوى على الأمونيا والمعادن والفسفور والكالسيوم والبوتاسيوم، وابتكرت الشركة للعملية جهاز تخمر air-lift فريد ذا سعة ١٥٠٠متراً مكعباً، ويقلل تصميم جهاز التخمر من متطلبات تبريد وعاء التخمر ومن مشكلة قيود الأكسجين.

وأنشأت(ICI) فى عام ١٩٨٠ مصنعاً ذا سعة إنتاجية بلغت ٥٠٠٠٠طن مترى من البروتين الناتج من الكائنات وحيدة الخلية فى العام فى مدينة بلينجهام

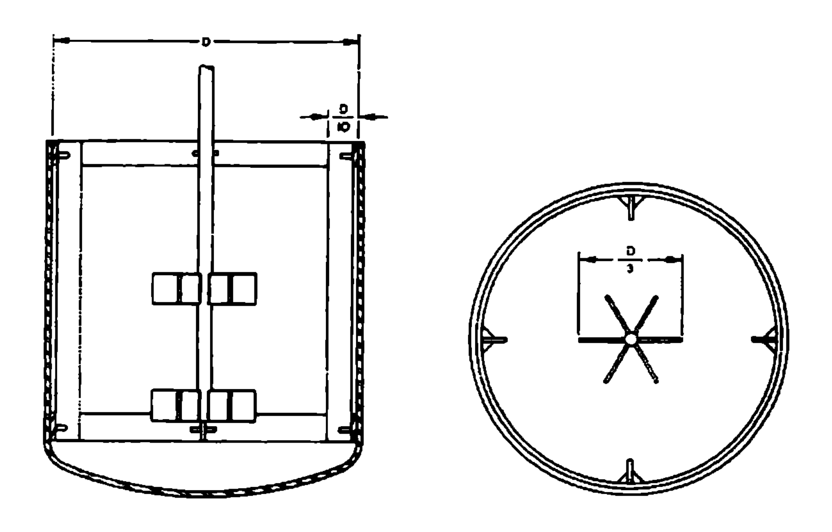
بإنجلترا، ومنذ ذلك الحين،عمل المصنع بشكل متقطع وكان ينــتج ٦٠٠٠ طنــاً مترياً فى الشهر، وكانت البكتيريا تنمو على الميثانول كمادة لتزويدها بالطاقــة. ويعطى اثنان طناً مترياً من الميثانول طنًــا متريًــا واحــداً مــن "البــروطين" الجاف،كبروتين من الكائنات وحيدة الخلية، والمنتج المجفف المحتوى على نسبة ٧٢% بروتين و٨%رطوبة، يتم بيعه كعليقة حيوانية فى أسواق أوروبا الغربية.

ولما كان فول الصويا المجروش يباع حاليا بسعر ١٩٠دولار للطن المتــرى ،لذا لم يعد البروطين منافساً كمادة غذائية حيوانية، ولا يجرى تشغيل المصــنع على المستوى التجارى حالياً ، وبرغم ذلك،فإن تطــوير عمليــة(ICI) لصــنع بروتين من وحيدات الخلية،يعطى مثالاً لتطبيق الهندسة الكيميائية الحديثــة فــى مجال التكنولوجيا الحيوية.

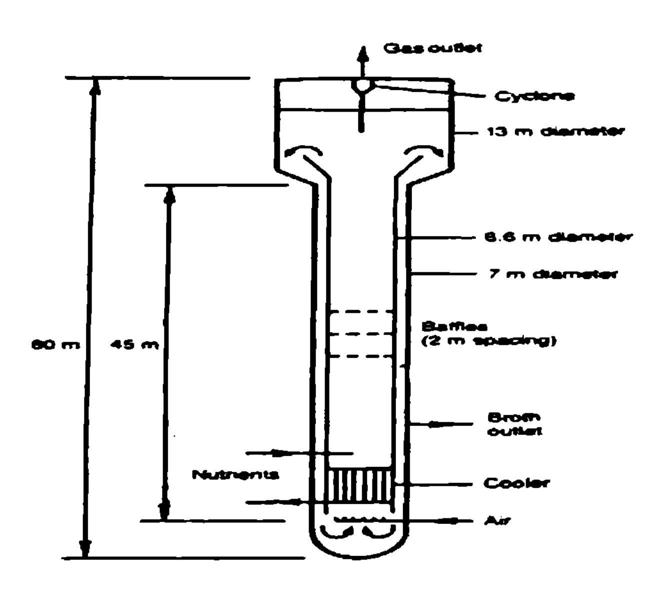


شكل ٦-١ شكل تخطيطى لعملية الإنتاج المستمر للبروتين من البكتيريا وحيدة الخلية، ويجرى إدخال الملقم المحتوى على البكتيريا إلى خزان التخمر(م)، ويجب تعقيم المواد الغذائية الأساسية(الميثانول،الأمونيا،حمض الفسفوريك والأملاح المعدنية فى هــذه الحالــة) قبــل إضافتها لمنع دخول البكتيريا التى يحتمل أن تلوث المنتج، ويجب أن تزود محتويات جهاز التخمر بالهواء والمــاء المبــرد، لتشــتيت الحرارة المتولدة أثناء نمو البكتيريا.

وفى نظام الإنتاج المستمر للبروتين،يجرى إضافة المواد الغذائية بمجرد استهلاكها للحفاظ على التركيز المطلوب للنمو البكتيرى ، ويعالج المحلول المحتوى على البكتيريا المسحوبة،لجعل البكتيريا تتكتل أو تتلبد وتتبذ، وقد يمكن إعادة المحلول إلى جهاز التخمر مــرة أخرى،فى الوقت الذى يجرى فيه تجفيف البكتيريا بالرش وطحنها للحصول على المنتج النهائى.



شكل ٦-٢ رسم تخطيطي لجهاز التخمر من نوع baffled stirred-tank ، والهواء الذي به الجهاز يجري تشتيته بواسطة وسيلة تقليب تشبه المروحة، و تعمل المصدات البارزة من جوانب الخزان الداخلية(الشبيهة بالمثلث) على خلط محتويات الخزان وتزويده بالأكسجين.



شكل ٦-٣ رسم تخطيطي لجهاز تخمر ICI المزود بدورة ضغط ، تبلغ سعة هذا الجهاز ١٥٠٠ مترا مكعبا، ويتم إدخال الهواء المضغوط من فتحة في قاع الجهاز،وتخلط المحتويات بواسطة فقاعات الهواء الصاعد، وتساعد المصدات التي يزود بها الجهاز على الإمداد الجيد بالأكسجين عن طريق تشتيت فقاعات الهواء،التي تتمدد مع صعودها ضد انحدار الكبس الهيدروليكي في الجهاز.

أثناء تطوير شركةICI لمنتج "البروطين"، بحث علمائها إمكانية تحسين تحول الإيثانول إلى بروتين من وحيـدات الخليـة عـن طريـق التعـديل الـوراثى للبكتيرM.methylotrophus لكى يستخدم الأمونيا كمادة نمو، وقاموا بإدخال جين فى البكتيريا لتخليق إنزيم لهضم الأمونيا وتمثيلها،ويكون أكثر كفاءة من الإنزيم الموجود داخل البكتيريا، وعلى الرغم من أن الجين الجديد كان ثابتاً فى البكتيريا وقام بالتعبير عن الإنزيم هناك،إلا أنه حدثت زيادة تتراوح ما بين٣% إلى ٥% فقط من نتاج البروتين من الناتج من السلالة البكتيرية المعدلة وراثياً.

الخمـــائـــر
Yeasts

تطورت التكنولوجيا الحديثة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية تطوراً كبيراً منذ الحرب العالمَية الثانية، ويجرى حالياً فى العديد مـن الـدول إنتـاج منتجات الخميرة على المستوى التجارى للاستهلاك الآدمى والحيوانى(جدول ٦-٥)، بالإضافة إلى ذلك، تباع حالياً خميرة الخبز التى تنمو على المـولاس فـى صورة مكون غذائى ومادة تكسب النكهة فى الطعام،بالإضافة إلـى اسـتخدامها كعامل لتخمير الخبز.

ويمكن تربية الخميرة على عدد من الركائز، التى تشتمل مواد كربوهيدراتية فى كل من صورتيها المعقدتين مثل، النشا والبسيطة مثل سـكريات الجلوكـوز والسكروز واللكتوز، ويمكن اختيار بديل مثل المواد الخام المحتوية على السكر مثل شراب الذرة و المولاس وشرش الجبن، ويمكن لبعض الخمـائر أن تنمـو على هيدروكربونات ذات سلسلة مستقيمة ،والتى يتم الحصول عليها من البترول أو من الإيثانول أو الميثانول.

جدول ٦-٥ عمليات إنتاج تجارية نموذجية للبروتين من الخميرة وحيدة الخلية.

المادة الخام	الخميرة	الإنتاجية	المنتج	الجهة المنتجة
شرش الجبن	Kluyverom-yces fragilis	٥٠٠٠ طن/ سنة	خميرة الطعام،مغذى للتخمر	مؤسسة الأغذية العالمية،جانو، ويسكنسون
الإيثانول	Candida utilis	١٠٠٠٠طن/ سنة	خميرة تريولاسكون غذائى	منتجات المزارع النقية،هتشنسون،مينسوتا
N-paraffins	Candida Gullienmon-dis	٢٠٠٠٠- ٤٠٠٠٠طن/ سنة	خميرة طعام	معهد أبحاث الاتحاد العام للتخليق الحيوى للبروتين،روسيا
مخلفات الكبريتيت	Candida utilis	١٥طن/ يوم	خميرة تريولا	مؤسسة رينلاندر للورق،رينلاندر، ويسكنسون

وتحتاج الخميرة بالإضافة إلى مصدر الكربون إلى مصدر نتروجين، ويمكن تزويد النتروجين بإضافة الأمونيا أو أملاح الأمنيوم إلى وسط المزرعة، وتحتاج الخميرة أيضاً إلى إضافة من المواد الغذائية المعدنية.

وتشابه الاحتياجات المطلوبة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية تلك الاحتياجات التى ذكرناها بالنسبة للبكتيريا، ويجب أن يكون للخميرة فترة تكاثر تتراوح ما بين ٢ إلى ٣ ساعات، ويجب أن تتحمل الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة وأن تكون ثابتة وراثياً، وتعطى إنتاجًا مرضيا من الركيزة المستخدمة ولا تسبب أمراضاً للنبات أو الحيوان أو الإنسان.

وتشابه التكنولوجيا المستخدمة فى إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية التكنولوجيا المستخدمة فى صنع المنتجات البكتيرية(شكل ٦-٤)، ويعتبر جهاز التخمر من نوع الخزان المتحرك بواسطة الصدادات،من أشهر الأنواع المستخدمة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية،على الرغم من إمكانية استخدام أجهزة التخمر من نوع الهواء الصاعدair -lift fermentor، وكما هو

الحال فى المزارع البكتيرية،فإن الحرارة تنبعث أثناء نمو الخميرة،ولذا يجب أن يزود جهاز التخمر بنظام للتبريد.

ويمكن إجراء تخمرات الخميرة إما بنظام العبوةbatch أو بالنظام المستمرcontinuous mode أو بنظام ثالث يسمى "fed-batch" العبوة الملقمة، وفى عمليات"fed-batch"،تضاف الركيزة والمواد الغذائية الأخرى بطريقة متزايدة للوفاء بمتطلبات نمو الخميرة،فى الوقت الذى يحتفظ فيه بتركيز غذائى قليل جداً فى وسط النمو فى أى وقت، وتعطى هذه الطريقة من ٣,٥% إلى ٤,٥% من الوزن الجاف من المنتج بالمقارنة بـ ١إلى ١,٥ من الوزن الجاف من المنتج فى حالة استخدام نظام العبوة. ويجرى جمع الخلايا فى نظام fed-batch processes بنفس طريقة نظام العبوة.

وبالرغم من استخدام نظامى استزراع "fed-batch" والعبوةbatch فى إنتاج خميرة الخبز لسنوات عديدة،إلا أن التكنولوجيا التى طورت فى الآونة الأخيرة استطاعت أن تضبط وتراقب الأس الهيدروجينى وتركيز الركيزة،حتى يمكن استخدام عمليات النظام المستمر،حيث يمكن الحصول على تركيز من خلية الخميرة تصل إلى ١٦%(وزن جاف) من نظام العمليات المستمر.

وللخمائر مميزات معينة تفوق البكتيريا فى إنتاج البروتين من وحيدات الخلية، السبب الأول ، أن الخمائر تتحمل وسط حمضى أعلى يتراوح ما بين ٣,٥ إلى ٤,٥ بالمقارنة بالأسس الهيدروجينية القريبة من التعادل التى تفضلها البكتيريا. ونتيجة لذلك،يمكن أن تعمل عمليات إنتاج البروتين من الخميرة بنظام نظيف غير معقم عند أس هيدروجينى يتراوح ما بين ٤إلى ٤,٥،لأن معظم

السلالات البكتيرية المسببة للتلوث لا يمكنها أن تنمو في هذه الدرجة من الحمضية، والسبب الآخر،يبلغ قطر خلية الخميرة حوالي٠,٠٠٠٥سم بالمقارنة بقطر الخلية البكتيرية الذى يبلغ ٠,٠٠٠١سم، ونظراً لحجم خلية الخميرة الأكبر،فإنه يمكن فصلها من وسط النمو بواسطة النبذ الناتج عن الطرد المركزى دون الحاجة إلى إجراء مرحلة تلبيد.

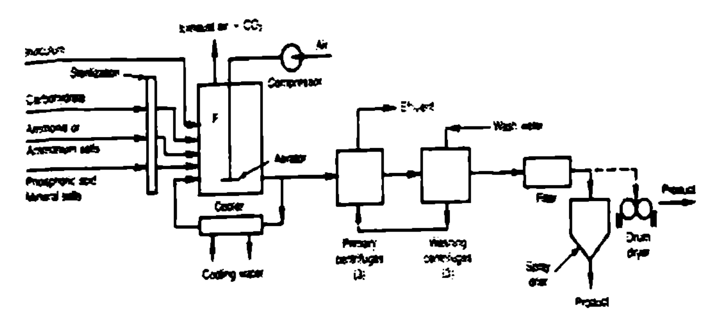
ويتوقف إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية على الوفاء باحتياجات مزارع التربية من الأكسجين ،حيث تتطلب الخميرة التى تنمو على الكربوهيدرات بصفة عامة كيلوجراماً واحداً تقريباً من الأكسجين لإنتاج كيلوجراماً واحداً من وزن الخلايا الجافة،وعندما تربى على الهيدروكربونات فإنها تحتاج لحوالى ضعف هذا المقدار من الأكسجين، ويزود الهواء الذى يجرى تعقيمه إما بواسطة مصفاة أو أنابيب مخرمة من خلال فتحة فى قاع الوعاء(جهاز التخمر)،أو بواسطة عجلة تهوية دوارة أو جهاز رفع هوائى،مشابه لتلك الأجهزة المستخدمة فى زراعة الخلايا البكتيرية،

ويمكن إنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية إما تحت ظروف تعقيم أو ظروف نظيفة وغير معقمة، ففى عملية نموذجية من عمليات العبوة أو العبوة التى يجرى تغذيتها،والتى يستخدم فيهما الكربوهيدرات كمصدر للطاقة والكربون،يعقم الوسط المزرعى من خلال مروره على مبادل حرارى، ثم يلقم فى أجهزة تخمر نظيفة، ويتأسس التحكم فى التلوث على الحصول على أس هيدروجينى يتراوح ما بين ٤إلى ٥، والتزويد بهواء معقم،والاحتفاظ بكميات كبيرة من خلايا الخميرة فى جهاز التخمر للقضاء على أية أعداد صغيرة من الكائنات المجهرية المسببة للتلوث، وفى بعض عمليات التخمر المستمرة

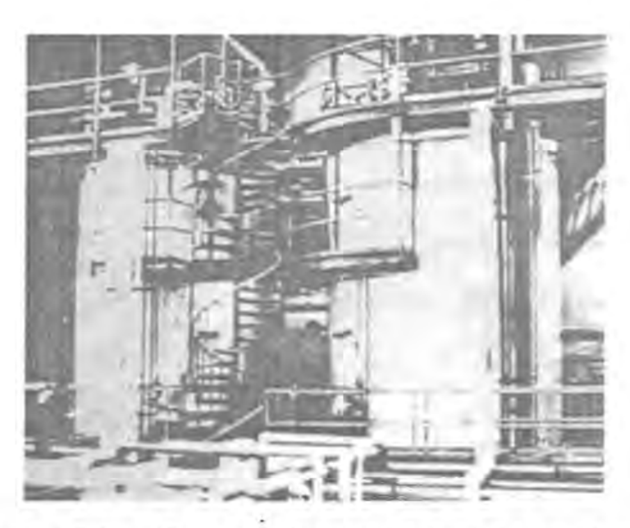
للخميرة،التى تستخدم الهيدروكربونات أو الإيثانول كركيزة ،تحتاج هذه العمليات إلى ظروف تعقيم كاملة للحصول على المقادير المطلوبة والمنتج الجيد.

وتصنع الخميرة من نوع Candida utilis، والتى تعرف باسم تريولا torula وتستخدم للاستهلاك الآدمى وكعليقة للحيوان من سلسلة كبيرة من المواد الخام والتى من بينها الإيثانول ومخلفات سائل الكبريتيت من مصانع الورق وهيدركربونات البرافين الطبيعى وشرش الجبن، وينتج قسم المنتجات الزراعة النقية فى شركة هركيولز Hercules،الخميرة من نوع Candida utilis فى مصنع بمدينة هتشنسون بولاية مينيسوتا، وتبلغ السعة الإنتاجية للمصنع ٧٥٠٠طناً أمريكيا(الطن الأمريكى=٢٠٠٠باوند) فى العام (شكل ٦-٥).

ويعمل المصنع بطريقة مستمرة ومعقمة ، ويستخدم الإيثانول كمصدر للكربون والطاقة، ويجرى سحب خلايا الخميرة بصورة مستمرة،حيث تغسل وتجفف بالرش لإنتاج منتج بمستوى غذائى، تجرى عليه عملية تصنيع أخرى لإنتاج مكسبات النكهة للطعام، ويبلغ الناتج النموذجى حوالى ٠,٧ طناً مترياً من الخميرة على أساس الوزن الجاف من كل طن مترى من الإيثانول المستهلك، ويصل المحتوى البروتينى فى المنتج من ٥٠% إلى ٥٥%.



شكل ٦-٤ رسم تخطيطى لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية بواسطة الكربوهيدرات، ويضاف الملقم المحتوى على خلايا الخميرة إلى جهاز التخمر(م) مع المواد الغذائية الأساسية،التى تشمل الأمونيا وحمض الفسفوريك وأملاح المعادن والكربوهيدرات كمصدر للطاقة والكربون، ويجرى تهوية خزان جهاز التخمر عن طريق الهواء المضغوط ويبرد بالماء، ويجرى فصل خلايا الخميرة من حساء التغذية بواسطة النبذ بالطرد المركزى،ثم يجرى غسل الخلايا وترشيحها وتجفيفها إما بواسطة رشاش أو مجفف أسطوانى.



شكل ٦- ٥ خزانات تخمر لإنتاج خميرة التريولا الصالحة للاستخدام الآدمى فى مصنع يقوم بتشغيله قسم منتجات المزرعــة النقيــة التابع لشركة هركيولز فى هتشسون بولاية مونيسوتا، وتبلغ القدرة الإنتاجية للمصنع ٧٥٠٠طناً أمريكيا فى العام من خميرة التريولا . ويستخدم هذا المنتج كوجبة غذائية للاستهلاك الآدمى والحيوانى.

وتنتج أيضاً المصانع التى تعمل بمستوى تجارى فـــى الولايـــات المتحـــدة وأوروبا خميرة الـــــC.utilis من مخلفات ســـائل الكبريتيـــت، وفـــى عمليـــة نموذجية،يعالج سائل الكبريتيت المحتوى على خليط مـــن الســـكريات بـــالجير وبواسطة البخار المزيل لنزع ثانى أكسيد الكبريـــت والكبريتيـــات والمركبـــات الكبريتية الأخرى التى تعوق نمو الخميرة، والعملية من النوع النظيـــف غيـــر المعقم كالتى ذكرناها من قبل، ويجـــرى اســـتخلاص المنـــتج بالنبـــذ بـــالطرد المركزى، والغسيل والتجفيف.

ويمكن أن يجرى إنتاج إما منتج غـــذائى حيـــوانى أو آدمـــى مـــن ســـائل الكبريتيت،ويتوقف الإنتاج على نظام التشغيل وضوابط التحكم فى جودة المنتج التى تفرض عليه. وتعطى طرق مخلفات سائل الكبريتيت إنتاجاً يصل إلى طن مترى واحد من الخميرة الجافة من كل طنين من السكر فى السائل.

وفى فترة الستينات،طورت شركة البترول البريطانية المحـــدودة وشـــركات أخرى، وبخاصة شركة كانجفيوشـــى المحـــدودة للصـــناعات الكيميائيـــة فـــى اليابان،عملية على المستوى التجارى لإنتاج البروتين من خميرة كانديدا وحيـــدة الخلية بواسطة هيدروكربونيات متصلة السلسلة مستخدمة كركيزة، وفى أوائـــل الستينات أنشأت شركة البترول البريطانية مصنعاً ذا قدرة إنتاجية ١٠٠٠٠٠طناً مترياً فى العام فى جزيرة سردينيا بالبحر المتوسط . وتطلبت عمليـــة المصـــنع استخدام هيدروكربونيات البارافين ذى نقاوة تتـــراوح مـــا بـــين ٩٥,٧%إلـــى ٩٧%،والتى كانت تحضر بالفرز الجزيئى molecular sieving، وصمم جهـــاز التخمر الذى تقلب محتوياته بالهواء لكى يعمل بصورة مستمرة وفى ظل ظروف تعقيم.

وعلى الرغم من الانتهاء من إنشاء المصنع ،إلا أنه لـــم يعمـــل بالمســـتوى التجارى،بسبب نزاع نشأ بين شركة البترول البريطانية والحكومة الإيطالية على جودة المنتج، تعلق بوجود مخلفات هيدروكربونية، ويقوم فى الوقت الحالى معهد كل الأبحاث المتحدة للتخليق الحيوى للبروتين فى روسيا بتشغيل مصنعه الوحيد على المستوى التجارى،لإنتاج البروتين من الخميرة وحيـــدة الخليـــة بواســـطة الهيدركربونيات، وقد أعلن أن قدرة التشغيل وصلت فى حـــدود مـــن ٢٠٠٠٠ إلى٤٠٠٠٠ طناً مترياً فى العام، ويستخدم الإنتاج فى صورة علـــف حيـــوانى. وتصل إنتاجية البروتين من الخميـــرة وحيـــدة الخليـــة والـــذى تســـتخدم فيـــه هيدركربونيات البارافين إلى مقدار ٠,٩طناً مترياً من الخميرة الجافة من كل طن مترى من الهيدروكربون، وتصل نسبة المحتوى البروتينى المستخرج من أنواع خميرة كانديدا فى العمليات التى تستخدم فيها الهيدروكربونيات فى حدود تتراوح

ما بين ٦٠إلي٦٥، التى تعتبر أعلى نوعاً ما من نسبة المحتوى البروتينى مــن نوع الـــــC.utilis.

وينتج من الشرش حوالى ١٤ مليون كيلوجراماً كل عام من تصنيع أنــواع الجبن فى الولايات المتحدة، ويحتوى شرش الجــبن علــى نســبة ٤% مــن اللاكتوز،الذى يستخدم كركيزة لخميــرة مــن نــوعfragilis (Kluyveromyces fragilis).

وتقوم شركة ملوكى العالمية للأغذية فى جانو بولايــة وسكونسن،بتشــغيل مصنع لإنتاج خميرةfragilis من شرش الجبن،الذى يجمع من مصـــانع الجــبن المجاورة، وبعد أن يلقم وسط النمو المحتوى على الشرش، تنمو الخميرة بتركيز ثابت يصل إلى بليون خلية فى المليمتر فى غضون من ٨ إلى ١٢ ساعة، ثــم تدار العملية بعد ذلك بنظام التغذية المستمرة بالشرش المخفف والمواد الغذائية، مع سحب منتج الخميرة، وتصل الإنتاجية ما بين ٠,٤٥ إلى ٠,٥٥ كيلوجرامــاً من الخميرة الجافة لكل كيلوجرام من اللاكتوز المستهلك.

ويصنع كل من المنتجات المعدة للاستهلاك الآدمى والحيوانى بهذه الطريقة، ويحتوى المنتج المعد للاستهلاك الحيوانى على٤٥%من البروتين الخام و٣%من الرطوبة،بينما يحتوى المنتج المعد للاستهلاك الآدمى على نسبة حوالي٥٠%من البروتين، وفى فرنسا، تصنع شركة بل فورماجورى منتج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية بطريقة مشابهة فى مصنع بمدينة فندوم أخيراً .

طورت شركة فيليبس للبترول فى بارتلسفيل بأوكلوهوهاما عمليــة جديــدة لإنتاج البروتين من الخميرة وحيدة الخلية، تعطى تركيزات خلوية أعلــى مــن الطرق القديمة، وفى هذه العملية التى حصــلت علــى بــراءة اختــراع عــام ١٩٨٣،حقق التصميم الجديد لآلية تقليب جهاز التخمر أعلــى معــدلات لنقــل

الأكسجين والتخلص من الحرارة العالية جداً. ويصل تركيز الخلية ما بين ١٢% و ١٦% من وزن المادة الجاف عندما تنمو الخميرة من نوعC.utilis على ركائز مثل إيثانول وسكروز ومولاس،أو عندما تنمو K.fragilis على شرش الجبن، وتعطى طرق الـfed-batch الأكثر تقليدية تركيزاً يدور حول ٤% كما ذكرنا من قبل، ونتيجة للتركيز المرتفع الذى يتم الحصول عليه من طريقة فيليبس،يمكن أن ينقل وسط المزرعة مباشرة إلى المجفف الرشاش دون حاجة إلى تركيزه فى البداية، والنتيجة هى توفير قدر كبير من تكاليف الطاقة.

العفن والفطريات العليا
Moulds and higher fungi

تستخدم العديد من الفطريات العليا كغذاء آدمى، وأحد الأمثلة على ذلك عش الغراب التجارى المشهور من جنسAgaricus campestris ، تنمو هذه الأنواع من عش الغراب على سماد حيوانى،أو سماد متكون من أعشاب متحللة، وزرع اليابانيون عش الغراب الشيتاك من جنس Cortinellus berkelyanus على كتل خشبية كبيرة لبعض الأشجار، والتى تم تلقم بمزيج معلق من بوغات الفطر، وفى الصين يزرع عش الغراب بادسترورى من نوعVolvaria volvacea على قش الأرز المبلل، ويجرى تلقيمه ببوغات من هذا الفطر.

وعلاوة على ذلك،يجرى إنتاج العديد من أطعمة المخمرة كالأرز والأسماك وفول الصويا فى آسيا بواسطة الفطر، وتشمل الأنواع الأخرى من الفطريات التي تستخدم كوجبة آدمية نوعTrichosporon pullulans الذى زرع خلال الحرب العالمية الأولى، وكان يزرع هذا الفطر فى أطباق مسطحة قليلاً تحتوى على وسط سائل يتكون من السكر، ويعتبر الفطر الغصينى، وهو الشبكة الخيطية

المتكونة من الفطر النامى من الفطريات الغنية بالدهون،وكان يجمع ويستخدم كمعجون.

والإنتاج الحالى من البروتين من الفطر وحيد الخلية،يتم الحصول عليه بطرق مشابهة لتلك الطرق المتبعة فى إنتاج منتجات الخميرة، وتعتبر السكريات البسيطة والمواد الخام المحتوية عليها من الركائز ملائمة لعدد كبير من الفطريات. ويصل تركيز المواد الكربوهيدراتية فى وسط النمو النموذجى حوالى ١٠%. وتعتبر الأمونيا أو ملح الأمنيوم من مصادر النتروجين المعتادة،وتضاف عادة إلى وسط المزرعة إضافات من مواد التغذية المعدنية . وتعتبر معدلات نمو الفطر والفطريات العليا التى تتراوح ما بين ٤ إلى ١٦ ساعة من معدلات النمو البطيئة بالمقارنة بمعدلات نمو الخميرة والبكتيريا،وينمو العفن والفطريات العليا فى درجات حرارة ما بين٢٥ إلى ٣٦ درجة مئوية، ويتراوح الأس الهيدروجينى ما بين ٣إلى ٧، إلا أن معظمها يزرع فى وسط حمضى أقل من ٥ للتقليل من التلوث الناشئ عن البكتيريا.

ويمكن استخدام نظم العبوة والعبوة المطعمة أو التشغيل المستمر لإنتاج البروتين من الفطر وحيد الخلية، على أنه يستخدم فى معظم الأحوال نظام العبوة فى أجهزة التخمر التقليدية المزودة بالهواء،الذى يعتبر البديل الأقل تكلفة. وتجرى عمليات التخمر فى ظل ظروف تعقيم ملائمة عندما يستخدم المنتج البروتينى للاستهلاك الآدمى، فى حين يمكن إنتاج الفطريات المعدة للاستهلاك الحيوانى فى ظروف نظيفة دون الحاجة إلى إجراءات التعقيم، ومثل أى من نظم التخمر الأخرى،يجب تزويد المخمر بوسيلة تبريد للتحكم فى الحرارة المنبعثة أثناء نمو الفطريات .

وعندما يستزرع العفن والفطريات العليا فى أجهزة تخمر مزودة بالتهوية،فإن الفطر النامى إما أن يكون فى صورة خيطية أو حبيبية،ويتوقف ذلك على الأنواع المستخدمة وظروف التهوية، وتساعد الصورة التى يتكون بها الفطر المنتج على سهولة استخلاص المنتج،حيث يمكن فصل الفطر الخيطى أو الحبيبى بسهولة من الوسط بواسطة المصافى أو المرشحات الفاكيومية الدوارة أو مكابس الترشيح بتكلفة بسيطة، ومع ذلك، لا تعتبر الأوعية المزودة بالهواء بصورة آلية ملاءمة لنمو الكائنات العضوية،حيث تتركز خيوط الفطر حول عمود الدوران،ولا تنتشر بانتظام خلال وسط النمو، ويمكن حل هذه المشكلة،إذا استخدمت أجهزة التخمر التى تقوم فيها التهوية بدور التقليب للوسط.

وطورت بعض الشركات عمليات لإنتاج البروتينات من الفطر وحيد الخلية(جدول٦-٦). وتقوم شركة راكس هوفز مكدوجال المحدودة بالمملكة المتحدة بصنع منتج يسمى ميكوبروتينMycoprotein، ينتجه الفطر Fusarium graminearum لسوق الغذاء الآدمى، ويستخدم الجلوكوز كمصدر لتزويد الفطر بالطاقة، الذى تصل دورة تكاثره إلى حوالى خمس ساعات ونصف الساعة ، ويصل الناتج إلى حوالى ٠,٥ كيلوجرام من وزن الخلايا الجاف من كل كيلوجرام واحد من السكر المستهلك.

جدول ٦-٦ عمليات مختارة على المستوى التجارى لإنتاج البروتين من الفطر وحيد الخلية.

المادة الخام	الكائن العضوى	الإنتاجية	المنتج	الجهة المنتجة
جلوكوز يستخدم كغذاء	Fusarium graminear-um	٥٠-١٠٠طن/سنة	ميكوبروتين (غذاء بشرى)	رانكس هوفز مكدوجال،هاى وإيكومب، المملكة المتحدة
شرش الجبن	Penicillium cyclopium	٣٠٠طن/سنة	غذاء حيوانى	هيوترى أس.أ فرنسا
مخلفات البن	Trichoder-ma harzianum	٤٠٠٠لتر	غذائى حيوانى	ICAITA جواتيمالا والسلفادور
مخلفات سائل الكبرتيت	Paecilomy-ces varioti	١٠٠٠٠طن/سنة	غذاء حيوانى (بروتين بكليو)	معهد أبحاث تامبيلا ولباب الورق،جامسانكوكسى،فنلندا
مخلفات مصانع لب الورق	Chaetomiu-m cellulolytic-um	طن واحد/يوم	غذاء حيوانى (عملية ووترلو)	إيفكورن المحدودة،فانكوفر بسى،كندا،جامعة ووترلو،اورينتو.

وتعالج المادة المنتجة لتقليل محتوى الحمض الريبى النوويRNA،حيث يسبب الاستهلاك البشرى لأكثر من ٢جرام فى اليوم حصوات فى الكلى أو الإصابة بداء النقرس، وبعد ترشيح كعكة الفطر الخيطية،يمكن أن تضاف إليها بعض النكهة ،وتشكل فى منتج يشبه لحم الدجاج الأبيض، ولها محتوى بروتينى يصل إلى ٤٥%، وتصل القدرة الإنتاجية لمصنع رانكز هوفز مكدوجال من٥٠ إلى ١٠٠ طن فى العام، لكنه يجرى حالياً إنتاج كميات قليلة لدراسة ذوق المستهلك فى المملكة المتحدة.

وفى خلال فترة الستينات طورت عمليات عديدة لإنتاج أفطورة عش الغراب لاستخدمها كعنصر يكسب الغذاء النكهة ، وعلى سبيل المثال،زرع قسم المنتجات الخاصة فى شركة ميد أمريكان دايرمن فى سبرنجفيلد بولاية ميسورى أفطورة عش الغراب الغشونة morel فى مزرعة مغمورة بالماء ومزودة بالهواء بدلاً من الركائز الجافة التى كانت تستخدم عادة فى زراعة جميع أنواع عش

الغراب، وكان يلقم وسط النمو الذى يحتوى على الجلوكـوز وشـراب الـذرة المنقوع وفوسفات الأمنيوم ببوغات عش الغراب فى جهاز تخمر تقليدى مـزود بالهواء، وبعد حوالى أربعة أيام كان يجمع الأفطـور،ليعطى منتجـاً يسـتخدم لإكساب النكهة للحساء والمقانق (السجق) والصلصات والأطعمة الأخرى ،إلا أن عملية الإنتاج قد توقفت عندما استورد عش الغراب بأسعار رخيصة.

وفى بعض العمليات،لم يقتصر استخدام الفطريات على اعتبارهـا مصـدراً لإنتاج البروتين من وحيدات الخلية،لكنها استخدمت أيضاً فى تنظيف المخلفـات الناتجة عن تصنيع الغذاء والمعامل الصـناعية، واختبـر المعهـد الأمريكـى المركزى لأبحاث الصناعة(ICAITI) فى جواتيمالا،استخدام الفطر مـن نـوع Trichoderma harzianum لمعالجة المخلفات الناتجة عن تصـنيع الـبن فـى السلفادور،فى حين يجرى فى نفس الوقت استخلاص البروتين مـن الكائنـات وحيدة الخلية لتقديمها كعلف حيوانى، وكان النظام الذى اختبرته الشركة يعمـل فى ظروف غير معقمة. وازداد محتوى المواد الصلبة الميكروبية بحـوالى ٣,٢ جرام لكل لتر فى خلال ٢٤ ساعة،واحتوى المنتج علـى ٦٥% بـروتين مـن الوزن الجاف، وقد تم تشغيل المصنع كوحدة إرشادية.

وفى فنلندا،اشترك معهد أبحاث الورق واللباب الفنلندى مع تـامبيلاTampela لتطوير عملية بكيلو"Pekilo" التى استخدمت فطر Paecilomyces varioti لتقليل قدرات مخلفات سائل الكبريتيت المستهلك على التلوث، وأعطى التخمر حـوالى ٣جرامات من الميسيليوم الفطرى لكل لتر من وسط النمو فى الساعة الواحـدة، واستخلص البروتين الفطرى بواسطة الترشيح ثم غسل وجفف، وكانت تصـل نسبة المحتوى البروتينى فى البروتين الذى كان يستخدم كغذاء حيوانى ما بـين ٥٥ %إلى ٦٠%. وكانت القدرة الإنتاجية للمصنع الفنلندى ١٠٠٠٠

لمادة فى العام، وهو رقم يدل على أن هذه العملية تعد من أكبر العمليات المنتجة للبروتين من الفطر وحيد الخلية، إلا أن الظروف الاقتصادية الحالية،لا تسمح باستمرار الإنتاج من بروتين بكليو.

ويمكن أيضاً تحسين قيمة المخلفات الزراعية أو الناتجة من الغابات أو من تصنيع الأغذية لاستخدامها كغذاء للحيوان من خلال معالجة "الركيزة الصلبة"،لكى تعطى حمأة شبه صلبة، تحتوى على نسبة رطوبة من ٥٠ %إلى ٨٠%ثم يضاف إليها بعد ذلك سماد تجارى لتزويدها بعنصرى النتروجين والفسفور.

وتشمل أجهزة التخمر التى تستخدم طرق الركيزة الصلبة، الأطباق البسيطة المزودة بالهواء والأبراج المزودة بالهواء والأسطوانات الدوارة والأوعية الأنبوبية المسحوجة والخزانات المقلبة وركم الرياح.

وطور الباحثون فى جامعة ووترلو فى أورينتو بكندا طريقة لاستخدام الفطر Chaetomium cellulolyticum لتحويل الكربوهيدرات السليليوزية الموجودة فى مخلفات مصانع الورق والغابات والزراعية إلى منتج بروتينى من كائنات وحيدة الخلية، وأنشأت شركةEnvirocon Ltd مصنعاً إرشادياً فى فانكوفر فى كولومبيا البريطانية،الذى تأسست على عملية ووترلو،وكانت قدرته الإنتاجية طناً واحداً فى اليوم من البروتين من الكائنات وحيدة الخلية.

ويجرى تحضين الحمأة المعقمة فى مصنع لباب الورق مع فطر C.cellulolyticum ، ويضاف إليها المواد الغذائية المناسبة فى جهاز تخمر سعته ٤٠٠ لتر لمدة ٢٤ساعة، ثم ينقل المنتج من هذا المخمر إلى مخمر آخر سعته ٤٠٠٠ لتراً، وبعد ٣٦ ساعة يصل التخمر لمرحلة يمكن أن يتم فيها الجمع المستمر للمنتج، والطريقة البديلة ،يمكن تشغيل المخمر بطريقة العبوة،

ويمكن الحصول على ٠,٥كيلوجرام من البروتين من وحيدة الخلية والذى يحتوى على ٤٢% بروتين من كل كيلوجرام واحد من الحمأة.

أمان المنتج وجودته

Product quality and safety

نسب البروتين المذكورة سابقاً فى كل المنتجات البروتينية المنتجة من كائنات وحيدة الخلية،هى قيم تقريبية مبنية على أساس قياسات محتويات النتروجين الكلية، وعلى الرغم من أن هذه القيم تتراوح ما بين ٤٥ %إلى ٦٠ % من وزن الخلايا الجاف،فإنه يدخل فيها جزء مهم من الأحماض النووية،التى تحتوى على النتروجين، وتشكل نسبة ٥%إلى ١٥% من وزن الخلايا الجاف، وهذه المواد لا تحتوى على قيمة غذائية للحيوانات غير المجترة،وكما ذكرنا من قبل، يجب ألا يزيد تناول الإنسان من هذه المواد يجب عن ٢جرام فى اليوم، ويمكن أن تزيل معالجة الخلايا بالأحماض أو القلويات أو الإنزيمات هذه الأحماض النووية.

بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يكون هناك نقص فى بعض الأحماض الأمينية الأساسية فى البروتين الناتج من الكائنات وحيدة الخلية،ولا تستطيع الحيوانات أن تخلقه لنفسها، وعلى سبيل المثال، أوضحت الدراسات التى أجريت على دجاج وخنازير الشى أهمية أن يضاف لمنتجات البروتين من وحيدات الخلية حمض الميثيونين methionine وهو الحمض الأمينى المحتمل وجوده بتركيزات غير كافية فى الوجبة الغذائية المثالية، بالإضافة إلى أنه يجب أن يتم يجرى ضبط محتويات أحماض الأرجينين arginine والليسين lysine فى الأطعمة التى تقدم

الحيوانات الأليفة(الكلاب،القطط،...ألخ). ويمكن تربية دجاج الشواء بطريقة ناجحة على غذاء يحتوى من ٧%إلى ١٥% بروتين من وحيدات الخلية.

وتسمح التنظيمات الحالية لإدارة الغذاء والدواء الأمريكية حالياً باستخدام الخلايا الجافة من خمائر الخباز من أصناف التريولا والفراجليس ومركز بروتينى يستخرج من خميرة الخباز فى الغذاء الآدمى، وفى المملكة المتحدة،سمحت وزارة الزراعة والمصايد والأغذية بإجراء دراسات اختبار السوق لبديل الدجاج من الميكوبروتين،الذى أنتجته شركة رانكس هوفز ماكدوجال من الفطر F.graminearum، وقد سمحت الوزارة أيضاً باستخدام الغذاء الحيوانى الذى أنتجته شركة الصناعات الكيميائية الإمبريالية من الخلايا المجففة من الفطر M.methylotrophus .

وطورت المجموعة الاستشارية للبروتين التابعة للأمم المتحدة مجموعة من القوانين الإرشادية لإنتاج وتقييم المنتجات البروتينية من الكائنات وحيدة الخلية، وتقدم مجموعة القوانين هذه معايير تحدد الجودة الغذائية وأمان المنتج،كما حددته دراسات التغذية التى أجريت على الفئران والدواجن والدواب مثل الدجاج والخنازير وعجول البتلو،وقد تتطلب الوكالات التنظيمية الحكومية اختباراً إضافياً على المنتجات لتحديد،ما إذا كانت تلك المنتجات يمكن أن يتسبب عنها سرطان أو تشوهات فى المواليد أو طفرات جينية.

اقتصاديات إنتاج البروتين من كائنات وحيدة الخلية
The economics of single-cell protein production

تشمل العوامل المؤثرة على الجدوى الاقتصادية لإنتاج البروتين من الكائنات وحيدة الخلية : التكاليف الرأسمالية لإنشاء الوحدات الإنتاجية، وتكاليف تصنيع المواد الخام، الطاقة،العمالة،الصيانة،معالجة المخلفات والاستهلاك فى قيمة

المواد ،وموقع المصنع بالنسبة لموردى المواد الخام وموقعه بالنسبة لأسواق المنتج.

فى منتصف السبعينات،كانت تتراوح التكاليف الرأسمالية لإنتاج بروتين من كائنات وحيدة الخلية صالح للاستهلاك الآدمى من مادة الميثانول ما بين ٦٦٠دولاراً إلى ١٠٠٠دولار للطن المترى من المصانع ذات القدرات الإنتاجية السنوية من٥٠٠٠٠ إلى ١٠٠٠٠٠ طنًا متريًا فى العام، وتقترب التكاليف الرأسمالية حالياً من ضعف القيم السابقة، ونتيجة لذلك،فليس من المثير للدهشة ألا يتم إنشاء الكثير من المصانع الجديدة ذات القدرة الإنتاجية التجارية، ومع ذلك،فقد أجريت تحسينات وأضيفت بعض المنشآت للمصانع القائمة .

وسوف يتوقف انتشار أسواق منتجات البروتين من الكائنات وحيدة الخلية كمادة غذائية حيوانية على أسعار المنتجات،ومدى الكفاءة التى تطور بها هذه المنتجات نمو دجاج الشواء ودجاج البيض والديوك الرومى والخنازير بالمقارنة بفاعلية المواد البروتينية الحالية، مثل فول الصويا والعليقة المصنعة من لحوم الأسماك.

وتوضح الدراسات المكثفة التى أجرتها شركة البترول البريطانية وشركة الصناعات الكيميائية الإمبريالية على المواد الغذائية المقدمة للماشية والدواب من منتجاتها البروتينية من الكائنات وحيدة الخلية،نتائج فاعلية أنواع التغذية المطلوبة للوفاء بمتطلبات العملاء ووكالات التنظيم الحكومية بقيمة هذه المنتجات للاستخدام كغذاء يقدم للماشية والدواب والدواجن، التى تشمل الدجاج والخنازير التى تربى للاستهلاك الآدمى.

وتعد النكهة والقوام بالإضافة إلى القيمة الغذائية من المتطلبات المهمة لقبول البروتينات من الكائنات وحيدة الخلية كغذاء آدمى، وتعتبر مثل هذه الاستخدامات

من المواد الغذائية التى تكسب النكهة أو تساعد فى اختمار الخبز سوق رئيسى فى الوقت الحاضر، فعلى سبيل المثال،استخدمت مشتقات البروتين المصنع من لخميرة كمواد تكسب النكهة للأطعمة لسنوات عديدة . وتضاف تريولا الخميرة فى تصنيع اللحوم كعامل مكسب للنكهة،وبطبيعة الحال تستخدم خميرة الخباز فى صناعة الخبز والمنتجات المخمرة الأخرى، بالإضافة إلى ذلك، فأى منتج بروتينى من الكائنات وحيدة الخلية،يجب أن يفى بالمتطلبات التنظيمية للوكالات الحكومية قبل طرحه فى الأسواق كغذاء للإنسان أو للحيوان.

المستقبل:

ما هو مستقبل المنتجات البروتينية التى تنتجها الكائنات المجهرية وحيدة الخلية؟

اتضح من هذه الدراسة الجدوى التكنولوجية لتصنيع البروتينات من كائنات وحيدة الخلية بمقادير كبيرة، فهناك عدد محدود من العمليات التجارية يجرى تنفيذها حالياً على نطاق محدود فى بعض من الدول على مستوى العالم، وسوف يتوقف إدخال منتجات بروتينية جديدة من الكائنات المجهرية وحيدة الخلية بصورة أكبر على الاعتبارات الاقتصادية والتسويقية والتنظيمية، فضلاً عن المعوقات التكنولوجية.وفى غالب الظن ، سوف يقتصر استخدام البروتينات من وحيدات الخلية أساساً على الإضافات البروتينية أو المكونات التى تؤدى وظائف معينة،على سبيل المثال،كالتى تستخدم كعوامل مكسبات للنكهة أو التخمير، وسوف تكون استخدامات البروتينات من كائنات وحيدة الخلية جذابة بصورة كبيرة فى المجالات التى تكون فيها الركائز رخيصة التكاليف ،مثل مخلفات المواد الكربوهيدراتية،وفى الوقت الذى يكون فيه نقص من المواد الغذائية البروتينية مثل، فول الصويا والعلف المصنع من لحوم الأسماك.

الفصل السابع :

الغســل البكتيــرى والتعديــن الحيــوى

Bacterial 'leaching and biomining

كانت الكائنات المجهرية تشكل معادن القشرة الأرضية وتحللها منذ عصــور جيولوجية سحيقة،وقد استفادت عمليات التعدين منذ أمد طويل من أنشطة تلــك الميكروبات الموجودة بصورة طبيعية، وخاصة قدرة بعض أنواع البكتيريا على استخلاص المعادن من الخامات غير القابلة للذوبان، ولحقبة تعود إلــى القــرن العاشر قبل الميلاد،استخلص عمال المناجم النحاس فى منطقة حــوض البحــر المتوسط ،الذى غسلته البكتيريا فى مياه صرف المناجم على الرغم مــن عــدم درايتهم بالدور الميكروبى فى هذا المجال، وقد كان الرومان فى القــرن الأول الميلادى ومن بعدهم أهالى ويلز فى القرن السادس عشر والأسبان الذين عملوا فى منجم ريو تنتو Rio Tinto فى القرن الثامن عشر،على يقين من اســتخدامهم الغسل الميكروبى فى استخلاص المعادن.

بيد أن إسهام البكتيريا فى غسل المعادن لم يكن معروفاً حتى فتــرة قريبــة نسبيا، فلم ترد التقارير الأولى عن دور أنواع معينة من البكتيريا فــى غســل كبريتيدات الحديد والزنك،والتى لم معروفة فى ذلك الحين،إلا فى العشرينيات من هذا القرن، وقد أهمل إلى حد كبير الدور الأساسى الذى تقوم به البكتيريــا فــى غسل المعادن حتى عام ١٩٤٧ ،عندما قام آرثر كــولمر وM.E.Hinkle مــن جامعة ويست فرجينيا فى مورجان تاون بالتعرف على بكتيــر يســمى حاليــاً

بـــــThiobacillus ferrooxidans بأنه الكائن العضوى المسؤول بصفة رئيســة عن غسل خامات كبريتيد المعادن.

وحالياً يجرى استخدام الغسل البكتيرى بصورة ناجحة فى العديـد مـن دول العالم لاستخلاص المعادن من سلسلة متنوعة من الخامات، والمعادن الرئيســية المستخلصة هى: النحاس واليورانيوم،على الرغم من أنه يمكن الحصول أيضاً على الكوبالت والنيكل والزنك والذهب ، وفى عام ١٩٨٣ جاء ترتيب الولايات المتحدة فى إنتاج النحاس الثانى بعد إنتاج شيلى فقط، واستخلص ما يزيد علـى ١٠% من نحاس الولايات المتحدة عن طريق الغسل البكتيرى، وبلغـت قيمـة إنتاج النحاس فى الولايات المتحدة وحدها ما قيمته ٣٥٠مليون دولاراً أمريكياً، واليورانيوم حوالى ٢٠مليون دولاراً أمريكياً فى عام ١٩٨٥، وقد قدرت شركة جورهام إنترناشيونالGorham International,Inc احتمـال أن يصـل الإنتـاج السنوى على مستوى العالم من صناعة المعادن المستخلصة بواسطة الميكروبات فى عام ٢٠٠٠ إلى ٩٠ بليوناً من الدولارات.

وحظى التعدين الحيوى فى السنوات القلائل الماضـية باهتمـام متزايـد،لما للتكنولوجيا من إمكانات تساعد على التخفيف من المشاكل العديدة التى تواجهها صناعة التعدين فى الوقت الحالى، وتتمثل إحدى هذه المشـاكل الكبـرى فـى استنزاف ترسـيبات المعـادن جيـدة الصـنفhigh-grade mineral deposits والاحتياج الناشئ عن التعدين من أعماق كبيرة، وفى العديد من الحالات،يمكن استخدام البكتيريا فى غسل المعدن المطلوب من ترسيبات عميقـة أو بمرتبـة منخفضة دون الحاجة لإزالته من باطن الأرض،وبالتالى تقـل تكـاليف جلـب كميات هائلة من الخام أو مخلفات الصخر إلى سطح الأرض.

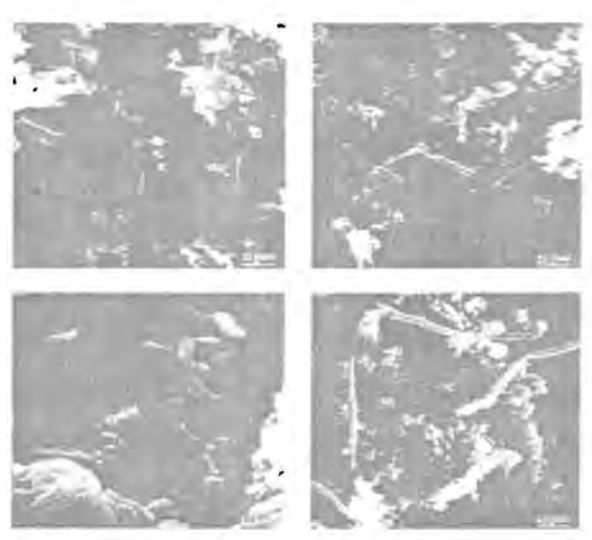
علاوة على ذلك،تستهلك العديد من النظم التقليدية لمعالجة خامات المعادن،خصوصاً تلك الخامات المقاومة للمعالجة الحرارية مقادير هائلة من الطاقة، وقد يكون البديل الموفر للطاقة،هو الغسل الحيوى للخامات والركائز،التى تتطلب قدراً قليلاً من الطاقة.

وللغسل الحيوى أيضاً فوائده البيئية المحتملة، فقد كانت المشكلة القائمة تكمن منذ أمد بعيد فى العديد من عمليات التعدين من الانبعاث غير المحكم للمعادن والأحماض الذى يحدث عندما تعمل البكتيريا على المخلفات الموجودة فى نفايات المنجم ومخلفات السدود، ويمكن أن يؤدى الغسل المحكم لمخلفات الصخر فى عمليات التعدين التقليدية إلى استخلاص المعادن المهمة من المواقع،بالإضافة إلى حماية البيئة من هذا المصدر من التلوث.

بالإضافة إلى ذلك، لا يمكن أن تحترق الاحتياطيات الضخمة من الوقود الأحفورى حالياً، مثل الفحم والبترول دون تلوث بيئى غير مقبول بسبب احتوائها على نسب عالية من الكبريت، وينجم عن احتراق الوقود المحتوى على الكبريت تصاعد حمض الكبريتيك إلى طبقات الجو، الذى يسهم فى إحداث "الأمطار الحمضية"acid rain،التى تصيب النبات وصحة الحيوان بأضرار بالغة،خاصة فى شرق كندا والمناطق الشمالية الشرقية من الولايات المتحدة وبعض أجزاء من غرب أوروبا، ويمكن للغسل الحيوى أن يزيل الكبريت من الوقود الأحفورى.

بكتيريا الاستخلاص الحيوى
Bioleaching bacteria

تم عزل عدة أنواع مختلفة من الكائنات المجهرية من الأماكن التى يجرى بها الغسل الحيوى(شكل ٧-١)، ومن أنواع الكائنات المجهرية الأكثر أهمية فى عملية الغسل : Thiobacillus ferroomxidans و T.thiooxidans و Leptospirillum ferrooxidans وعدد آخر من الكائنات المجهرية التى تنتمى لجنس الـ Sulfolobus، وتكيفت جميع هذه الكائنات العضوية على المعيشة فى ظروف بيئاتها الطبيعية القاسية،ويمكنها تحمل المحاليل الحمضية وغالباً ما تعمل فى ظل درجات حرارة عالية وتستمد الطاقة التى تحتاجها للنمو من أكسدة المواد غير العضوية.



شكل ٧-١ مسح إلكترونى لصور مصغرة لكائنات مجهرية مصاحبة لجزيئات خلم،فجزيئات الخام فى الصورة(أ) و(ب) مغطاة ببكتيريا قضيبية الشكل، وترتبط البكتيريا ذات الشكل الحلزونى بالجزيئات فى الصورة(ج)، أما فى الصورة(د) تحمل الجزيئات كل من البكتيريا والبروزات الخيطية الطويلة لميسيليوم فطرى.

والبكتيريا منْ جنس T.ferrooxidans ،التى تعتبر أفضل ما تم دراسته من أنواع بكتيريا الغسل الحيوى،هى بكتيريا صغيرة قضيبية الشكل، تنمو بشكل جيد

غنى المحاليل شديدة الحمضية،ويتراوح الأس الهيدروجينى ما بـــين ١,٥ إلـــى ٢,٥(فالماء النقى المتعادل له أس هيدروجينى ٧) وتستطيع هـــذه البكتيريـــا أن تستمد طاقتها من أكسدة حديد الحديدوز(+Fe٢) إلى حديد الحديديك(+Fe٣) ومن أكسدة الصور المختزلة من الكبريت إلى حمض كبريتيك، ويعتبــر الأكســجين المتقبل المفضل للإلكترونات المزالة أثناء تفــاعلات الأكســدة، وفــى غيــاب الأكسجين،يمكن أن يستخدم الكائن العضوى حديد الحديديك كمتقبل إلكترون بديل لأكسدة الكبريت المختزل.

وللبكتيرT.ferrooxidans متطلبات غذائية متواضعة جداً ، فكل السلالات ذاتية الاغتذاء الإجبارى ،والذى يعنى أنها تستخدم ثانى أكسيد الكربــون مــن الجــو كمصدر وحيد للكربون لتخليق مكوناتها العضوية، وفى حقيقة الأمر،فهــى لا يمكنها أن تنمو على مصادر كربون عضوية، وعلاوة على ذلك،تستطيع العديد من سلالات T.ferrooxidans أن تثبت النتروجين،إذ تحول النتروجين الجزيئى الموجود فى الجو إلى أمونيا ومواد غذائية أخرى تحتوى على النتروجين الــذى تحتاج إليه، ويعد مزج عينة من بيريت الحديد(FeS)فى مــاء محمــض كــافى لضمان نمو معظم السلالات على حساب البيريت.

وعلى الرغم من أنT.ferrooxidans تعتبر من أهم الكائنات العضــوية فـــى استخلاص المعادن من خاماتها،إلا أنه يبدو أنها لا تعمل بمفردها، فغالباً ما توجد نامية مــع أنــواع البكتيريـــا الأخرى،التـــى تشــمل البكتيريـــا مــن جــنس T.thiooxidans،التى تقوم بأكسدة الكبريت،بالإضافة إلى البكتيرياT.acidophilus

و Acidiphilium cryptum، وغالباً ما تكون مزارع البكتيريا المختلطة أكثر كفاءة في تحليل الخام مما لو قامت به البكتيرياT.ferrooxidans وحدها.

ويمكن أن يتم الغسل الحيوى للمعادن من خام الكبريت عند درجات حـــرارة تتراوح ما بين ٢٠ °إ لي٨٠ ° مئوية، وفى درجة حرارة ٥٠ °مئوية، يمكـــن عزل البكتيريا من جـــنس TH ،والتـــى ســـميت بهـــذا الاســـم لأنهـــا محبـــة للحرارةthermophilic إلى حد ما،وتشابه البكتيريـــاThiobacillus فـــى بعـــض النواحى، ومع ذلك ففى درجات حرارة ما بين ٦٠ إلي٨٠ ° مئوية،تقوم بعض أعضاء من جنس البكتيرياSulfolobus باستخلاص المعادن من عـــدة خامـــات مختلفة، ولا تستخدم هذه الكائنات حالياً فى عمليات الغســـل علـــى المســـتوى التجارى،بينما قد تثبت أهميتها فى النهاية بأنها الكائنات النشطة بصورة خاصة فى مهاجمة خامات المعادن التى تقاوم الاستخلاص عن أنواع البكتيريا الأخرى.

تفاعلات الاستخلاص

Leaching reactions

تتضمن تفاعلات الاستخلاص بصفة عامة، تحويل خامات المعـــادن غيـــر القابلة للإذابة،والتى يغلـــب عليهـــا أنـــواع الكبريتيـــدات،إلى مركبـــات قابلـــة للذوبان،التى يمكن أن يفصل منها المعدن المطلوب بسهولة تامـــة(شـــكل٧-٢)، ويمكن لبكتيريا الاستخلاص القيام بهذا التحويل بصورة مباشرة عـــن طريـــق أكسدة كبريتيدات المعدن للحصول على حديـــد الحديـــديك،وحمض الكبريتيـــك

وكبريتيتات المعدن،التى تتوقف هويتها على نوع الخام، ونورد فىما يلى بعض الأمثلة لتفاعلات الاستخلاص التى تنتج عن الهجوم البكتيرى المباشر:

$٤FeS_٢(pyrite) + ١٥O_٢ + ٢H_٢O \rightarrow ٢Fe_٢(SO_٤)_٣ + ٢H_٢SO_٤$ (١)

$٤CuFeS_٢(chalcopyrite) + ١٧O_٢ + ٢H_٢SO_٤ \rightarrow ٤CuSO_٤ + ٢Fe_٢(SO_٤)_٣ + ٢H_٢O$ (٢)

$٢FeAsS(arsenopyrite) + ٧O_٢ + ٢H_٢O \rightarrow ٢FeAsO_٤ + ٢H_٢SO_٤$ (٣)

$CuS(covellite) + ٢O_٢ \rightarrow CuSO_٤$ (٤)

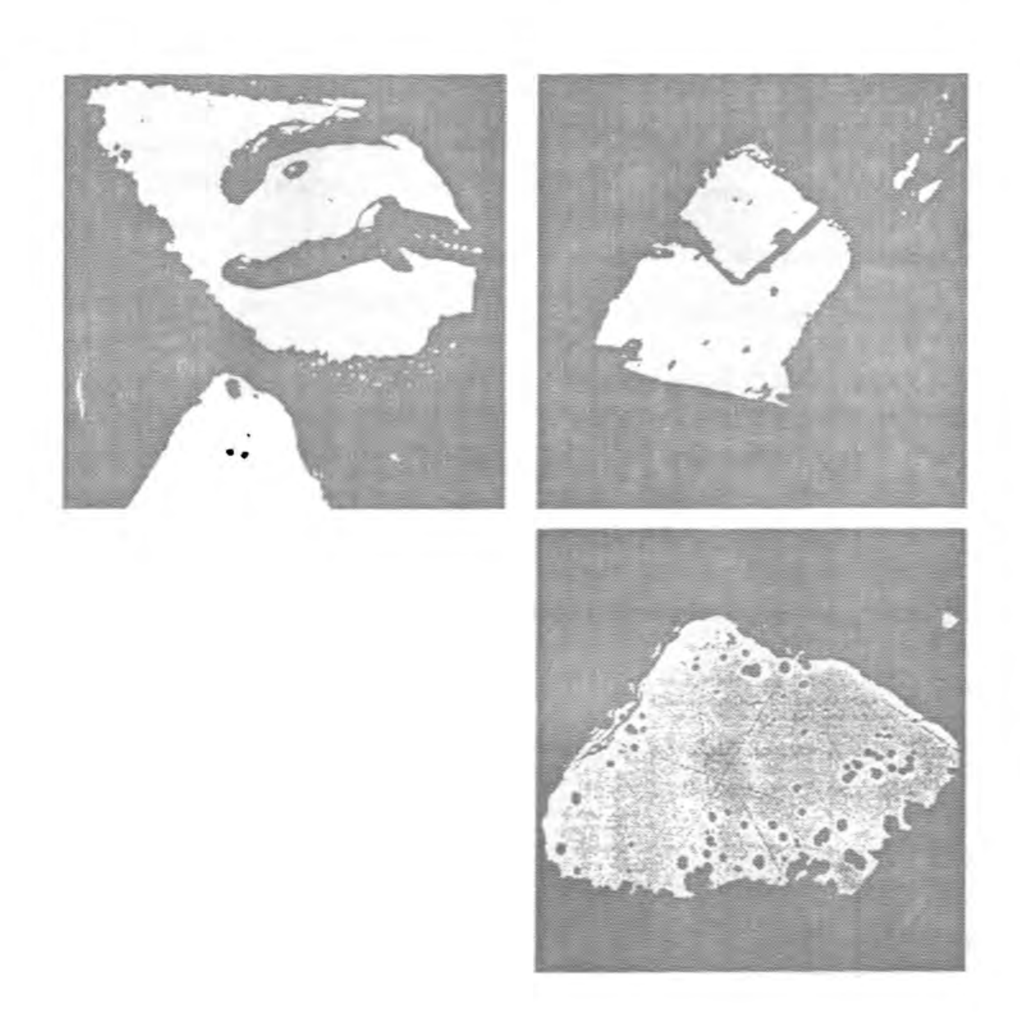
والبديل عن ذلك ، فقد يكون الغسل البكتيرى للمعادن بصورة غير مباشـــرة، فكما هو موضح فى التفاعلات من (٥) إلى (٨)،فإن حديد الحديـــديك وحمـــض الكبريتيك الناتجان من الأكسدة المباشرة لكبريتيدات المعـــدن،يمكنها أن تؤكســـد بعض الخامات لتكوين الأكسيدات والكبريتيتات التـــى تـــذوب فـــى المحاليـــل الحمضية، وعندما يكون الحديد موجود،فىحتمل أن يساهم كـــل مـــن التفاعـــل البكتيرى المباشر والتأثير الكيميائى غير المباشر فى استخلاص خامات المعدن.

$٢FeS_٢ + ٢Fe_٢(SO_٤)_٣ \rightarrow ٦FeSO_٤ + ٤S$ (٥)

$CuS + Fe_٢(SO_٤)_٣ \rightarrow CuSO_٤ + ٢FeSO_٤ + S$ (٦)

$UO_٢ + Fe_٢(SO_٤)_٣ \rightarrow UO_٢SO_٤ + ٢Fe_٢SO_٤$ (٧)

$UO_٣ + H_٢SO_٤ \rightarrow UO_٢SO_٤ + H_٢O$ (٨)



شكل ٧-٢ جزيئات بيريت ذات مسام غائرة عميقة، تكونت أثناء الترشيح الحيوي، ويبلغ قطر الجزيئات حوالي ثمانون ميكرومترا .

عمليات الغسل

Leaching operations

يمكن استخدام الغسل الحيوى فى استخلاص المعادن الثمينة مـن ترسـيبات المعادن منخفضة المرتبة،والتى يوجد منها مقادير هائلة، وطبقاً لأحد التقديرات، فهناك ما يزيد على ٣٣ مليار كيلوجراماً من النحاس فى مقالب المنـاجم فـى غرب الولايات المتحدة، ويحتوى أحد المقالب الموجودة فـى بنجهـام كـانيون بولاية يوتاه الأمريكية على أربعة مليارات من الأطنان من المخلفات المعدنيـة منخفضة المرتبة،ذات محتوى نحاس أقل من ٠,٥%.

ويتم تخطيط مقالب المناجم بحيث يمكن الاسـتفادة مـن الموقـع الطبيعـى للأرض،فهى تنشأ غالباً فى الأودية الطبيعية،بحيث ينساب الماء المستخدم فـى غسل المقالب بطبيعته إلى موقع تجمع طبيعى أو سد، ومن هناك، يجرى ضـخ السائل "الخصب" المحتوى على المعادن الذائبة التى تم غسلها من الخـام فـى مواسير إلى مصنع الاستخلاص.

ويلزم لاستخلاص مقلب فى أبسط صوره،غسل مخلفات الخـام فـى موقـع المقلب على دورات تتراوح ما بين سبعة إلى عشرة أيام،تتخللها فتـرة راحـة مساوية للفترة السابقة، وقد يزداد معدل استخلاص المعدن من المقلب بصـورة كبيرة باستخدام محلول ترشيح بدلاً من الماء،ذى أس هيدرجينى يتراوح ما بين ١,٧إلى ٢,٤، ويحتوى من اثنين إلى أربع جرامات فى اللتر من حديد الحديديك.

وفى مصنع الاستخلاص،غالباً ما يتكرر إزالة النحاس من سـائل الترشـيح الخصب عن طريق ترسيب المعدن بواسـطة حديـد معـدنى لإنتـاج نحـاسٌ

السمنتةcement copper الذى يجرى عليه تنقية أخرى بالانصهارsmelting، كما يمكن استخلاص النحاس أيضا عن طريق ترسيبه كهربياً علـى الكتـرودات مناسبة أو استخراجه بواسطة سائل مذيب.

وبعد استخلاص المعادن،يمكن تجديد مذيبات الترشيح وإعادة تشـغيلها فـى المقلب، وتتم عملية التجديد بمزج المحلول المستهلك بالهواء،وجعـل البكتيريـا المؤكسدة للحديد مثل T.ferrooxidans أن تقوم بتحويل حديد الحديدوز،الذى نتج أثناء الاستخلاص الكيميائى بأن يعود إلى حديد الحديديك وحمـض الكبريتيـك (معادلات تفاعلات ٩و١٠) :

$$4FeSO_4+O_2+H_2SO \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3+H_2O \quad (٩)$$

$$S_8 + 12\ O_2 + 8H_2O \rightarrow 8H_2SO_4 \quad (١٠)$$

ومع ذلك ،فمن الضرورى إضافة قليل من حمض الكبريتيك للحفاظ على أس هيدروجينى مناسب، ولما كان الترشيح فى المقلب يجرى بصورة بطيئة،فىمكن استخلاص مقدار ثابت نسبياً من المقلب لعدد من السنوات.

وقد يساعد الغسل المحكم للمعادن من مواقع المقالب على التقليـل ممـا قـد يشكل مصدراً خطيراً من مصادر التلـوث، وغسـل المعـادن يـتم بصـورة طبيعية،وينجم عنه تلوث المناطق المجاورة بالأحماض والمعادن الثقيلة، فالغسل المتأنى،الذى يجرى فىه جمع السوائل المنسكبة،سيقلل كثيراً من هذا التلوث.

تعالج الخامات عالية الرتبة بطريقة مختلفة نوعاً ما عن الطريقة التى تعـالج بها مخلفات الخامات منخفضة الرتبة، وتكوم مواد الخامات عالية الرتبة علـى قاعدة غير مسامية،لضمان عدم فقد محاليل الترشيح(أشـكال ٧-٣و ٧-٤و٧-٥)، وتوضع وسائل تجميع السائل وطريقـة الغسـيل الفعالـة فـوق أكـوام

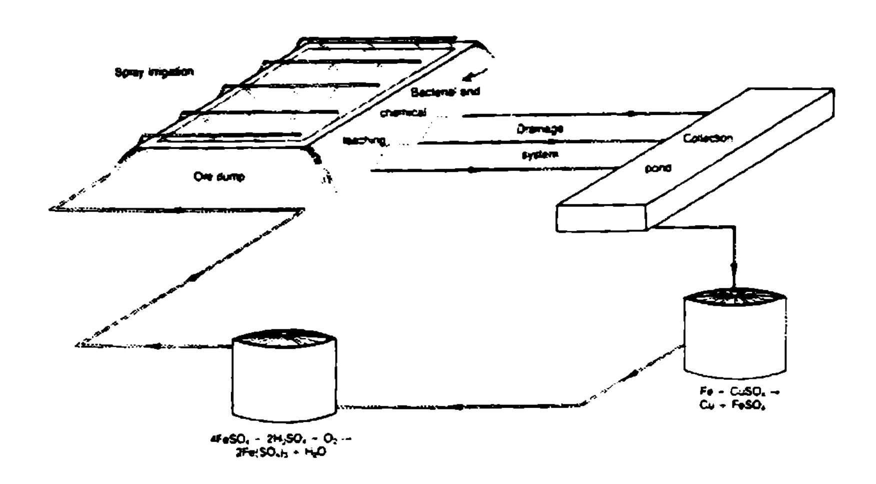
الخام،ونتيجة لذلك،تعمل هذه الوسائل على تقليل زمن دورة الترشيح، ويمكن أن يتم الترشيح بهذه الطريقة فى غضون شهور بالمقارنة بالطريقة المتبعة فى ترشيح المخلفات التى قد تستغرق سنوات.

والترشيح الراقودى،الذى تعالج فيه الخامات جيدة الصنف أو الركائز فى خزانات مزودة بالهواء،يعتبر من أكثر الوسائل كفاءة حتى عن طرق الأكوام،ويمكن أن ينجز العمل فى غضون أيام، وقد استخدمت طريقة الترشيح الراقودى بنجاح فى تحليل(هدم) خامات بيريت الزرنيخ المحتوى على الذهب قبل استخلاص الذهب.

ويمكن أيضاً استخلاص ترسيبات الخام فى مواقعها،دون الحاجة إلى إزالتها من المنجم، ويساعد ذلك على توفير تكلفة إحضار الخام إلى سطح الأرض،وقد يؤدى إلى التعدين الاقتصادى للترسيبات منخفضة المرتبة، وبعد أن يتم تكسير الخام بواسطة متفجرات موضوعة فى أماكن مناسبة،يجرى ضخ محلول الترشيح، بعد ذلك تجمع سوائل الترشيح الخصبة فى آبار الاستخلاص وتضخ إلى السطح من أجل استخلاص المعدن، ويجرى عادة إنتاج محاليل الترشيح على سطح المنجم بواسطة البكتيريا لأكسدة البيريت أو الخامات المناسبة الأخرى.

وهناك تطبيق آخر للاستخلاص فى الموقع،وهو استخلاص المعادن من هالات الخام منخفضة الرتبة التى تبقى بعد استنفاد المنجم، ففى منجم ستا نروك بكندا،يجرى غسل الأسقف والحوائط والأرضيات المستخدمة والجارى استخدامها بسائل ترشيح على فترات كل ثلاثة أشهر،وينتج عن ذلك ماء غسيل حمضى،يحتوى على تركيزات كافية من اليورانيوم المذاب لاستخدامها فى

استخلاص المعادن بطريقة مجدية اقتصادياً، كان يتم بهذه الطريقة الحصول على إنتاج من اليورانيوم يقدر بـ ٧,٥ طناً فى الشهر.



شكل ٧-٣ يوضح الشكل مخطط لعملية استخلاص كومة من الخام لاستخلاص النحاس، وبعد رش محلول الاستخلاص على الخام،يجرى جمع السائل المتغلغل فى المادة و نقله إلى مصنع الترسيب حيث يجرى استخلاص النحاس، ويجرى بعد ذلك تجديد محاليل الترشيح المستهلكة بواسطة البكتيريا المؤكسدة ويعاد تشغيلها عن طريق الضخ.

تحسين وراثى لبكتيريا الاستخلاص
Genetic improvement of leaching bacteria

على الرغم من أن طرق التعدين وتشغيل المعادن غير العضوية قد تكون لها الصفة السائدة فى المستقبل القريب،إلا أن التنافس الاقتصادى على الغسل الحيوى لاستخلاص كميات كبيرة من النحاس واليورانيوم من الخامات منخفضة الرتبة قد وضحت جدواه، ويوجه الباحثون انتباههم حالياً نحو تحسين السلالات البكتيرية المستخدمة فى الاستخلاص ، وهو مجال آخر من مجالات الأبحاث الجارية التى قد تستفيد من مجيء تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، فالاستغلال الوراثى للبكتيريا قد يتيح فى النهاية تطوير سلالات جديدة ذات معدلات نمو

سرع،ويزيد من كفاءة عمليات الاستخلاص وتحسين مقاومتها للمعادن التى لها تأثيرات سامة على الكائنات العضوية.إلا أنه قبل أن يتم إنجاز أى من التحسينات ، ستكون هناك حاجة ماسة إلى معرفة الشيء الكثير عـن الوراثـة الجزيئيـة لبكتيرياT.ferrooxidans وأنواع البكتيريا الأخرى التى تسهم فـى الاسـتخلاص الحيوى، فبالمقارنة بما يعرف ببكتيريا أ.كولاى E.coli والعصية الرقيقة Bacillus subtilis،التى أجريت عليهما دراسات مستفيضة،تلك الأنواع البكتيرية التـى لا تزال الهدف الرئيس لأبحاث الـ د.ن.أ المطعم،فلا تزال المعلومات المتوفرة عن أعضاء جنسT.ferrooxidans معلومات متفرقة نسبياً.

وبكتيرياT.ferrooxidans هى هدف رئيس للتحسين الوراثى،بسـبب دورهـا الرئيس فى عمليات الاستخلاص الحيوى، بالرغم من أنه قد يكـون ضـروريا أيضاً التبديل بأنواع أخرى من البكتيريا تسهم فى هذه العملية، ويتطلب تطـوير نظام لتعديل المكون الوراثى لبكتيرياT.ferrooxidans، أو أى نوع بكتيرى لهـذا الغرض خطوات عديدة ، أولاً،يجب التعرف علـى مميـزات مناسبة،تسـتخدم كعلاماتmarkers لتحديد واختيار السلالات البكتيرية التى تم تحويلها باكتسـاب مادة وراثية جديدة، ثانياً، يجب تحديد وتمييـز متجـه جزيئـات د.ن.أ يمكـن استخدامه فى إدخال جينات جديدة إلى البكتيريا ، ثالثاً، يجـب تطـوير وسـيلة لإدخال المتجهات فى سلالاتT.ferrooxidans المستقبلة ، وأخيراً،يجب عـزل الجينات التى تشفر عن الصفات المطلوبة وإدخالها فى جزيئات المتجه لنقلها إلى البكتيريا الجارى استغلالها .

وقد تم إجراء جميع هذه الخطوات مع بكتيريا أ.كـولاى، بينمـا لا تــزال الأبحاث المقارنة لبكتيرياT.ferrooxidans فى مراحلها الأولى، وقــد لا تكــون الأساليب التى ثبتت فاعليتها مع بكتيريا أ.كولاى مناسبة مع بكتيريا الاستخلاص الحيوى، ففى الوقت الذى تســتطيع بكتيريــاT.ferrooxidans تحمــل الأســس الهيدروجينية الحمضية،وتعتبر من الأنواع ذاتية الاغتذاء، إذا لم تستخدم ســوى ثانى أكسيد الكربون كمصدر وحيد للكربون،فــإن أ.كـولاى تحتــاج إلـــى أس هيدروجينى متعادل تقريباً وهى غير ذاتية الاغتذاءheterotroph أى أنها تحتــاج على الأقل إلى مركبات عضوية بسيطة لتكفل معيشتها . وعلــى البــاحثين أن يبــدأوا تقريبــاً مــن الصـــفر لاســتنباط طــرق للمعالجــة الوراثيــة لــبكتيرياT.ferrooxidans.

علامات اختيارية لبكتيريا ت.فيروكسيدان

Selectable markers for T.ferroxidans

لا توجد طريقة فعالة ١٠٠% لنقل جينات جديدة إلى الخلايا ،وتعتبر وســيلة اختيار تلك الخلايا التى اكتسبت المادة الوراثية المنقولــة وســيلة ضــرورية، فالخلايا البكتيريا المتحولة مثل أ.كولاى قد تم تحديدها تماماً لاختيارها لخاصية مكتسبة جديدة، تكون مقاومة للتسمم من معدن ثقيل أو مضاد حيوى،أو تغيير فى المتطلبات الغذائية للخلايا.

واحتمال أيون المعدن يعد دليلاً جذاباً بصفة خاصــة للدراســات الوراثيــة لبكتيرياT.ferrooxidans ، لأن لمقاومة المعدن المتزايدة إمكانية إضافة صــفة مهمة صناعيا للبكتيريا، وعلى الرغم من أن بكتيريــاT.ferrooxidans تقــاوم

بصورة طبيعية التركيزات العالية لسلسلة كبيرة من المعادن الثقيلة،إلا أن معظم السلالات تتأثر بـــالزئبق والـــزرنيخ والفضـــة واليورانيـــوم، والموليبـــدنيوم ، والتعرض لمثل هذه المعادن قد يقلل كفاءة البكتيريا، وعلى سبيل المثـــال، فقـــد يعاق استخلاص خامات بيريت الزرنيخ الحاملة للذهب أو الكتل المركزة بسبب إطلاق المركبات الزرنيخية السامة.

وقد تم التعرف على الجينات المشفرة عن المقاومة للزرنيخ والزئبـــق فـــى أنواع أخـــرى مـــن البكتيريـــا، فـــإذا أمكـــن إدخـــال تلـــك الجينـــات إلـــى بكتيرياT.ferrooxidans، فإنها لا يمكن أن تستخدم فقط كعلامات مختارة لتحويل الكائن العضوى لكنها قد تحسن أيضاً من قدراته على الاستخلاص .

وقد كان يجرى استخدام الجينات المقاومة للمضاد الحيوى غالبـــاً كعلامـــات مختارة، غير أن استخدامها مع بكتيرياT.ferrooxidans سيكون معقـــداً بســـبب متطلبات النمو غير العادى للكائنات العضوية، فالأس الهيدروجينى المـــنخفض والتركيز العالى لأيونـــات معـــدن مثـــل الحديـــد فـــى وســـط نمـــو بكتيريـــا T.ferrooxidans،يجعل العديد من المضادات الحيوية غير ثابت، ويـــزداد تعقـــد الموقف بسبب النمو البطيء للبكتير،الذى يتطلب أن تظل المضـــادات الحيويـــة نشطة لفترة طويلة، ونتيجة لذلك،فقد يتضح أن بكتيريـــاT.ferrooxidans قـــد لا تكون مقاومة إلا لمضاد حيوى ،حيث لا ينشط العامل المبيد للبكتير فى وجـــود الأس الهيدروجينى المنخفض والمحتوى العالى للحديد فى وسط النمو.

وعلى الرغم من أن بكتيرياT.ferrooxidans تتأثر بمضادات حيوية عديـــدة، تشتمل كلورامفنيكول chloramphenicol والأمبيسلين،فقد أتضح أنها تقاوم عـــدة مضـــــــادات حيويـــــــة أخرى،تشـــــــمل تتراســـــــيكلينtetracyline

والإستربتوميسينstreptomycin عندما تنمو فى ظروف طبيعية ، ومع ذلك، فقد اتضح أن المقاومة الظاهرية كانت بسبب خمود نشاط المضادات الحيوية، واحتمال وجود الحديد فى وسط النمو، وبتطوير وسط نمو لبكتيرياT.ferrooxidans خال من الحديد،وفى أس هيدروجينى ٤ بدلاً من الأس الهيدرجينى السابق الذى كان ما بين ١,٥ و٢,٥،استطاع الباحثون أن يوضحوا أن الكائن العضوى كان يتأثر بالمضاد الحيوى التتراسيكلين، فالتغيير المناسب لظروف نمو، قد تمكن من التعرف على ما إذا كانت بكتيرياT.ferrooxidans مقاومة بالفعل لمضاد حيوى أم لا.

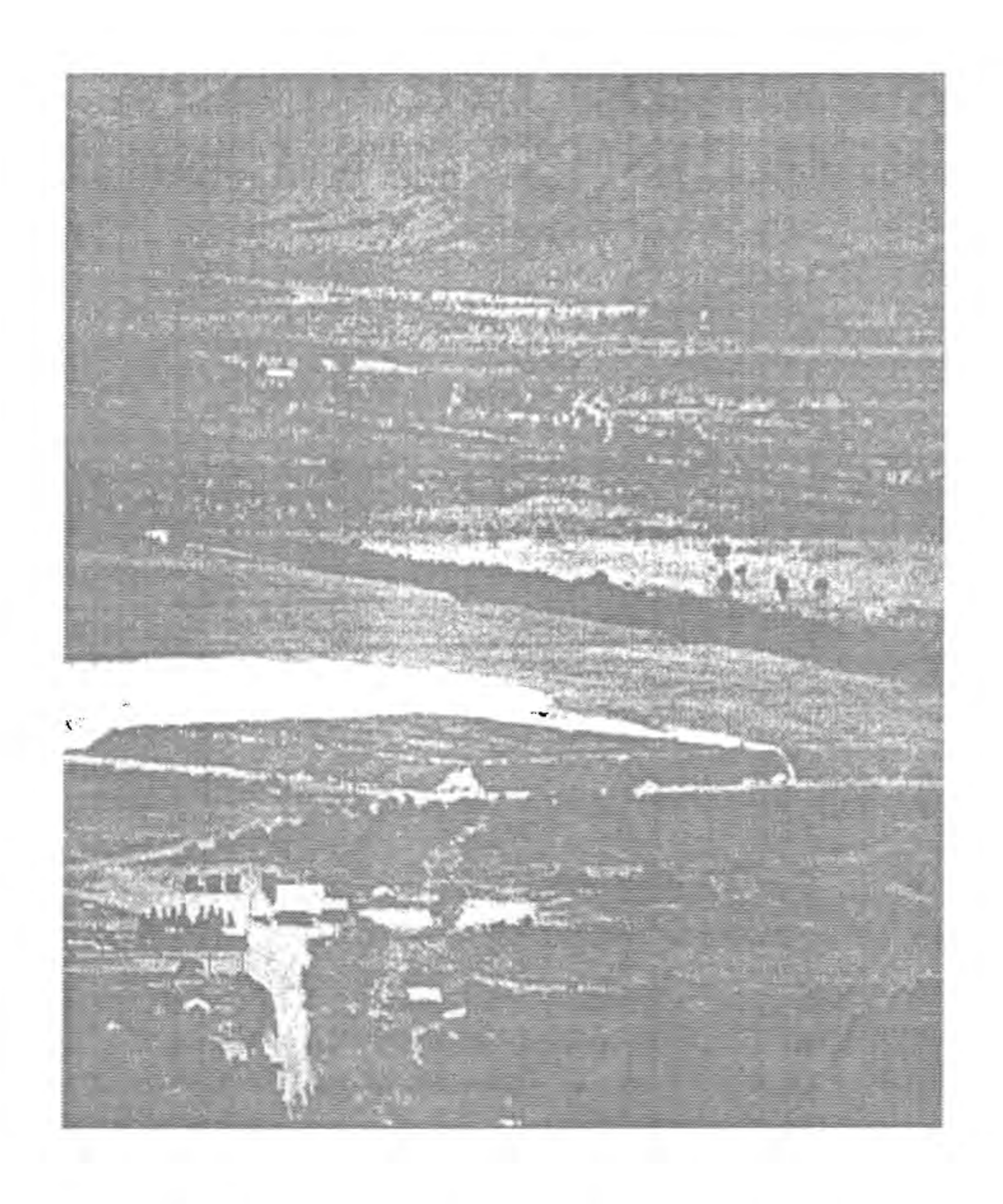
والطفرات الجينية التى تجعل البكتير يعتمد على إضافة أحد الأحماض الأمينية أو الفيتامين أو مادة غذائية أخرى إلى وسط المزرعة،لا يحتاج إليها نمو كائن عضوى من النوع البرى،قد أثبتت فائدة كبيرة طوال سنوات دراسة الوراثة الجزيئية، وقد تستخدم هذه السلالات الطافرة كأساس لاختيار نظام للمعالجة الوراثية،لأن إعادة إدخال نسخة سليمة من الجين الطافر،يخلص البكتيريا من الاعتماد على الغذاء،ومن ثم يجعلها تنمو فى غيابه، و حتى الآن على الأقل،لم يظهر أن بكتيرياT.ferrooxidans عرضة لاستراتيجية الاختيار هذه ، فلا يحتاج الكائن إلى أية مركبات عضوية لكى ينمو ،ولم تنتج معالجته حتى الآن بالعوامل المسببة للتحول الخلقى مثل الأشعة فوق البنفسجية والمادة الكيميائية(NTG) أى طافر بهذا المطلب.

وقد أوضح أخيراً، جون كوكسJohn Cox من مؤسسة مارتك Martek Corporation فى كولومبيا بولاية مريلاند،أن المعالجة بمادة(NTG) أعطت طافرات من البكتيرT.ferrooxidans يفتقد إلى بروتين rusticyanin ،وهو بروتين

يحتوى على النحاس،ويسهم فى تفاعلات تحول الإلكتــرون للبكتيــر، وتظهــر النتيجة أن التبدل الخلقيmutagenesis التقليدى بالمواد الكيميائية،يجب أن يحفــز الباحثين على المضى فى عزل طافرات مهمة أخرى.



شكل ٧- ٤ منطقة استخلاص أولية في منجم نحاس سوشيوداد مينرا بوداهويل فى سنتياجو بشيلى، وتصل أبعاد منطقة الاستخلاص نحو ٢٠٠متر عرض و٤٠٠متر طول، ولها ونشان ناقلان الخام وتفريغه ، و صنعت أرضية المناطق التى تحتوى على طبقات يبلغ سمكها ٢.٤ مترا من الخام المجروش من الخرسانة، وزودت بــ hypalon مانع للماء،و أيضا بنظام صرف لجمع السوائل التى تسربت من الخام، ويسمى سائل الاستخلاص بــ raffinate (النتاج المنقى بالإذابة) ويعاد تشغيله من مصنع استخراج المذيب،الذى يزيــل معظــم النحاس المستخلص من الدورة السابقة، ويحتويraffinate على ٨جم فى اللتر من حمض الكبريتيك،ومن ٠.٣ إلى ٠.٥ جم فى اللتر من متبقى النحاس، وخلال دورة الاستخلاص التى تستمر ١٨ يوما،تستخدم دورة الاستخلاص الأولية بمعدل ٠.٨لتر لكل دقيقة لكــل متــر مربع، ويستخلص الغسل الأولى ٩٠% من ثانى أكسيد النحاس و٤٥% من كبريتيدات النحاس، ويزال بعد ذلك الخام المستخلص مــن أماكنه، وينقل بالمقطورات إلى منطقة استخلاص ثانوية تبعد عن الأولى ١.٥كم.



شكل ٧-٥ مناطق ترشيح ثانوية لمنجم نحاس سوشيودك مينرا بودهويل ، و يستمر غسل منطقة الاستخلاص التى يصل ارتفاعها ٦متر لمدة ١٢٠ يوما، وأثناء تلك الفترة يجرى رش الخام بمحلول الغسل بمعدل ٠,٠٥ لترا فى الدقيقة لكل متر مسطح من الخام، ويستخلص الغسل الثانوى حوالى ٥٠% من النحاس المتبقى.

إنشــــاء متجــه

Vector construction

بالإضافة إلى محاولة إيجاد علامات اختيارية لبكتيرياT.ferrooxidans ، فقــد بدأ الباحثون أيضا فى استنباط متجهاتVectors لنقل جينات جديدة داخل ذلــك الكائن،وقد ثبت أن البلازميداتplasmids التى هى عبارة عــن قطــع دائريــة صغيرة من الـــ د.ن.أ، تتضاعف بصورة مستقلة عن الكرموسوم البكتيرى، أنها متجهات مفيدة جداً لنقل الجين إلى خلايا أ.كولاى.ويجب أن يكون أى متجــه قادر على أن يتضاعف فى الكائن العضوى الصناعى الذى يجرى اســتغلاله ، وســـواء أكانـــت أيـــة متجهـــات مـــن بكتيريـــا أ.كـــولاى ســـتتجح مـــع بكتيرياT.ferrooxidans ،التى لها فسيولوجية مختلفة تماماً،فإن ذلك يثير حاليـــاً مجالاً للجدل، ومع ذلك،فقد تم عـــزل بلازميـــدات مـــن عـــدد مـــن ســـلالات بكتيرياT.ferrooxidans،التى يمكن أن تستخدم كأساس لإنشـــاء متجهـــات لهـــذا البكتير.

وهناك شرط آخر لأى متجه،هو أن يكون لدية القدرة على التنقل بين العائل الصناعى وأحد العوائل الذى تم تشخيصها جيداً،مثل بكتيريا أ.كولاى أو البكتيريا العصوية الرقيقة،والتى عادة ما يستنسخ منها الجين ، وهذا يعنـــى أن مصـــدر تضاعف المتجه ،وهى قطعة النكليوتيد التى تحتوى على الإشـــارات الأساســـية لبدء تكاثر الـــــ د.ن.أ،لابد إما أن تكون مخصصة للعمل فى كلا العـــائلين،أو يجب أن يحتوى المتجه على مصدر نسخ لكل من النوعين، وقد أحرز كل مـــن دوجلاس رولنجزDouglas Rawling ودافيد وودز David Woodsمن جامعـــة كيب تاون بجنوب أفريقيا،بعض التقدم نحـــو تطـــوير متجـــه متنقـــل مناســـب لبكتيرياT.ferrooxidans.

فقد قام كل منهما بصورة مستقلة باستنساخ أربعة بلازميدات من بكتير الاستخلاص الحيوى فى متجه بلازميد أ.كولاى، وكانت البلازميدات المطعمة التى تحمل أيضاً جينات لمقاومة الكلورامفينيكول والتتراسيكلين، قادرة على التضاعف فى أ.كولاى من مصدر نسخ يقع فى د.ن.أ بكتيريا T.ferrooxidans، ونجح أيضاً مصدر التكاثر لأحد بلازميدات بكتيريا T.ferrooxidans مع البكتير Pseudomonas aeruginosa، وبسبب سلسلة العائل العريضة من هذا التسلسل، فللبلازميد الذى يحتوى عليه إمكانية أن يكون متجهاً متنقلاً مفيداً جدا فى تجارب الاستغلال الوراثى المقبلة التى تتضمن لبكتيرياT.ferrooxidans.

وعلى الرغم من تكاثر بلازميداتT.ferrooxidans فى أ.كولاى، إلا أنه لا يبدو أن الجينات التى تحملها تُعَبَّر هناك، ولم يعرف حتى الآن سبب عدم تعبير الجينات فى أ.كولاى. وفى حدود التصور أن الآلية المخلقة للبروتين فى أ.كولاى،فشلت فى التعرف على إشارات التحكم فى جين البكتير الآخر، ووفقاً لأراء رولنجز وودز وزميلتهما أوجينا باروس،فإن جينات بلازميدT.ferrooxidans عبّرت فى خلاصة خالية من خلية أ.كولاى.

نظم نقل الجين لبكتيريا ت.فيروكسيدان
Gene transfer systems for T.ferrooxidans

الطرق الثلاث التى تنقل بها الجينات إلى الخلايا البكتيرية هى:الانتقال العارض transduction والتحويل transformation والاقتران conjugation. ويعتمد الانتقال العارض على استخدام فيروس بكتيرى لتوصيل الد.ن.أ للخلايا التى يصيبها، ولما لم يكتشف فيروس حتى الآن لبكتيرياT.ferrooxidans،فمن غير الممكن فى الوقت الحاضر استخدام هذا الأسلوب.

وتشمل طريقة التحويل على الامتصاص البسيط للخلايا لـــ د.ن.أ عارية. ومع ذلك ، يمكن تطبيق هذا الأسلوب مع سلسلة محدودة نسبياً من بكتيريا طبيعية،وقد تتغير الظروف المطلوبة لامتصاص الـــ د.ن.أ بدرجة كبيرة من بكتير لآخر، وغالباً ما يتطلب إيجاد الظروف الحرجة للتحويل موهبة في اكتشاف الأشياء، وحتى الآن لم تنجح الجهود الكبيرة لنقل خلايا العديد من سلالات بكتيريا T.ferrooxidans بينما لا تزال الجهود مستمرة.

وفى طريقة الاقتران ، ينتقل الـــ د.ن.أ بصورة مباشرة من خلية بكتيرية لأخرى، ويتأثر الاقتران بوجود بلازميدات كبيرة تحتوى على أكثر من ٣٠كيلو من قواعد الـــ د.ن.أ، ولديها جينات ناقلة(tra) ، وبعض البلازميدات التى تحمل جيناتtra، لا تستطيع أن تنقل إلا نفسها، ومع ذلك،فقد اكتشف الباحثون مجموعة من البلازميدات ذات سلاسل عائلة عريضة، لا يمكنها أن تنقل نفسها فقط،بل تستطيع أيضاً أن تساعد على نقل البلازميدات الأخرى التى لا تستطيع بنفسها أن تنتقل بين الخلايا البكتيرية ، ويعنى وجود بلازميدات ذات سلسلة عائل عريضة ،أن الاقتران هو الطريقة التى يمكن تطبيقها على نطاق واسع لنقل البلازميدات بين البكتيريا.

وحيث أن قدرة البلازميدات الذاتية على النقل لم يتم عزلها منT.ferrooxidans ، فقد بحث رولنجز وودز ما إذا كان يمكن تجنيد بلازميداتT.ferrooxidans المطعمةالمستنسخة لتنتقل بين الخلايا البكتيرية بواسطة بلازميدات أخرى، وقد أوضحا حتى الآن أن بعض بلازميدات ذات سلسلة العائل العريضة،يمكن أن تجعل بلازميداتT.ferrooxidans المطعمة تتحرك مرات كثيرة بين سلالات خلايا مختلفة من أ.كـ ''ى، ومع ذلك،فلم يستطيعا حتى الآن توضيح حركة البلازميدات المطعمة من أ.كـولاى

إلىT.ferrooxidans، ولا يعتبر هذا مثيراً للدهشة نظراً لمتطلبات النمو المختلفة تماماً لكلا النوعين من البكتيريا، وتتطلب طريقة الاقتران طاقة،ولم يكـن مـن المستطاع حتى الآن،استنباط وسط،يمكن أن تتلاقى فيه مطالبهما من الطاقة في نفس الوقت.

وتأتي الطريقة المناسبة لحل هذه المشكلة من استخدام نوع بكتيري ثالث،ذلك النـوع الـذي يسـتطيع أن ينمـو مـع كـلاً مـن بكتيريـا أ.كـولاى وبكتيرياT.ferrooxidans، ويعمل وسيطاً بينهما، والفكرة هي أن البلازميد سينتقل على مرحلتين،الأولى من أ.كولاى إلى الوسـيط، وبعـد ذلـك مـن الوسـيط إلىT.ferrooxidans. وهناك بعض الأنواع البكتيرية التي يمكن أن تـؤدي دور الوسـيط، مثـل أنـواع العصـيات الكبريتيـةThiobacillus، والتـي تشـمل علىT.novellus وT.intermedius ، والتي قد تعتبر وسائط مناسبة، فهي تستطيع أن تنمو مثل أ.كولاى،في أس هيدروجيني متعـادل،وفي وسـط عضـوي وأن تتحمل أيضا ظروف الأس الهيدروجيني المنخفضة والوسط غير العضوي الذي تتطلبه بكتيرياT.ferrooxidans.

وقد تم تحقيق المرحلة الأولى لنقل البلازميد من أ.كولاى إلىT.novellus،ولا تزال المرحلة الثانية لنقل البلازميد إلىT.ferrooxidans محل الدراسة، وسـوف تحتاج التجارب لشهور حتى تكتمل، حيث تنمو بكتيريا T.ferrooxidans بصورة بطيئة جداً، وفي تلك الأثناء،فإن قدرة بلازميداتT.ferrooxidans على أن تعبـأ ،تتوقف على أن البكتير يحتوي على بلازميدات قدرة النقل الذاتي ، وأن البحث عنها قد يستغرق بعض الوقت.

استنساخ وتعبير جينات ت. فيروكسيدان
Cloning and expressing of T. ferrooxidans

إن استنساخ جيناتT.ferrooxidans له بعض المميزات المحتملة، أولاً، سوف يتيح فرصة تحليل تركيب الجينات ووظائفها،وبالتالى يؤدى إلــى فهــم أفضــل للبيولوجيا الجزيئية للبكتير، وثانياً، فقد توفر جينات يمكن استخدامها فى التحسين الوراثى للـــT.ferrooxidans.

وتستمد معظم الجينات المتاحة حالياً لهذا الغرض، من أنواع لا تربطها صلة ببكتيرياT.ferrooxidans مثل بكتيريا أ.كولاى، وحتى الآن، لا يعرف الكثير من المعلومات المتعلقة بكيفية التحكم فى تعبير الجينات داخلT.ferrooxidans، ولم يستطع الباحثون تحديد ما إذا كان يمكن تعبير جينـــات أ.كــولاى فـــى بكتيـــر الاستخلاص ، وباستخدام جينات T.ferrooxidans المستنسخة ،سوف يجنب أية مشاكل تعبير قد تواجه جينات من أنواع أخرى.

وعلى الرغم من القدرة الهائلة لبكتيريا T.ferrooxidans علـــى اســـتخلاص النتروجين فى صورة أمونيا،فإن ندرة النتروجين فى سوائل الاســـتخلاص ،قـــد يقلل من كفاءة هذا البكتير فى استخلاص الخام، وعلى ذلك فإن تفاعلات تثبيت النتروجين وتمثيل الغذاء تعد من الأهداف الممكنة للتحسين الوراثى.

ويحفز إنزيم جلتامين سينسازglutamine synthetase أحد التفاعلات الرئيسة التى تمثل بها الأمونيا غذائياً:

L-glutamate +NH٤ +ATP → L-gultamine +ADP+Pi

ومنـــذ عهـــد قريـــب، استنســـخ وودز ورولنجـــز جـــين glnA بكتيرياT.ferrooxidans فى بكتيريا أ.كولاى،الذى يشفر عـن إنـزيم جلتـامين سينساز.وقد صنع إنزيمT.ferrooxidans لبكتيريا أ.كولاى بواسطة تعبير جينى بدأ بمعزز مادة حفازة مـن بكتيـرT.ferrooxidans. (والمعـزز هـو أحـد التسلاسلات المنظمة المطلوبة لبدء تعبير الجين،)، و لا يعرف ما إذا كان هـذا المعزز هو المعزز الطبيعى للتعبير عن جينglnA البكتيرT.ferrooxidans أم لا، بيد أن التعبير عن الجين فى أ.كولاى،هو الدلالة الأولى على أن معـززاً مـن بكتير ذاتى الاغتذاء الإجبارى ، يعمل بصورة فعالة فى بكتير يعتمد فى تغذيتـه على عدة مصادر.

ويعيق النمو البطيء لبكتيرT.ferrooxidans عملية عزل الإنزيمات وتمييزها ، والذى ينـتج عنـه حصـيلة خلويـة قليلـة، وسـوف يتغلـب استنسـاخ جيناتT.ferrooxidans وتعبيرها فى أ.كولاى على هذه المشاكل،وسوف يتـيح الفرصة لإنتاج كميات كافىة من الإنزيم من أجل تمييزه ، ويشابه إنزيم جلتامين سينساز الموجود فى بكتيرياT.ferrooxidans إنزيم أنواع البكتيريا الأخرى فى بعض النواحى على الأقل، فبروتين جلتامين سينساز النموذجى يتكون مـن ١٢ وحدة تحت رئيسة متطابقة،يحتوى كل منها على وزن جزيئى حوالى ٦٠٠٠٠، والبروتين الذى يشفر عنه بكتير جينglnA فىT.ferrooxidans له وزن جزيئى أيضـاً حـوالى ٦٠٠٠٠، وعـلاوة علـى ذلـك،ترتبط إنزيماتT.ferrooxidansوأ.كولاى بصورة مستضدية، إذ تـوحى بـأن لهمـا تسلسلات أحماض أمينية متشابهة،بالرغم مما يبدو من أن التسلسلات النكليوتيدية للجينات المتناظرة غير متشـابهة. وقـد يحـدث هـذا لأن الشـفرة الجينيـة

متدنية؛بمعنى أن بعض الأحماض الأمينية يتم تخصيصها فى أكثر من كـــودون نكليوتيدى. وعندما يتحدد التسلسل النكليوتيدى لجين glnA فـــى T.ferrooxidans، يمكن أن يقارن بمثيله فى جينات glnA الأخرى،للتعرف على ما إذا كان بكتير الاستخلاص يظهر نمطاً مختلفاً من الاستخدام الكودونى.

والقدرة على تثبيت النتروجين مسألة مهمة بالنسبة لأى كائن عضوى يعيش فى بيئة تفتقر إلى ذلك النوع من الغذاء(انظر الفصـــل التاســـع الـــذى ينـــاقش موضوع تثبيت النتروجين)،وأوضحت مارى ماكنتوش من مؤسســـة الأبحـــاث الميكروبولوجية فى بورتون داون بانجلترا،أنه كان عام ١٩٧٨ ســـلالة واحـــدة على الأقل من T.ferrooxidans يمكنها دمج النتروجين الجوى مع مادتها الخلوية، وعلى الرغم من أن الدراسات لم توضح قدرة البكتيريا على تثبيت النتـــروجين فى عمليات غسل أكوام الخام.ومع ذلك،توضح الدلائل أن تلك المقدرة موجـــودة بين سلالات T.ferrooxidans.ووفقاً لوودز ورولنجـــز و Ing-Martine Pretorius فى كيب تاون،فإن الـــ د.ن.أ من خمس سلالات يحتوى على جينات nifH و nifD و nifk، التى تعتبر ثلاث من الجينات البنائية المطلوبـــة لتخليـــق آليـــة تثبيـــت النتروجين، وعلاوة على ذلك، فإن الجينات مرتبة علـــى الـــــ د.ن.أ بـــنفس الترتيب الموجود فى بكتير Klebsiella pneumoniae ،ذلك البكتير الذى يعد مـــن النماذج الأولى لدراسات تثبيت النتروجين.

وتوحى الدلالة أيضا على أن بكتير T.ferrooxidans يحتوى على جينات ntrA و ntrB و ntrC،وهى الجينات الثلاثة التى لها أدوار رئيسة فـــى تنظـــيم تثبيـــت النتروجين،بالإضافة إلى الأوجه العديدة الأخرى من أيض النتروجين البكتيرى ،

ولا تزال هناك دراسات جارية،لتحديد ما إذا كانت تنظيم وتحكم جيناتntr وnif لبكتيرT.ferrooxidans تشابه تنظيم وتحكم الجينات المماثلة فى الأنواع البكتيرية الأخرى.

وتظهر فسيولوجية T.ferrooxidans تناقض مثير للاهتمام بالنسبة لمتطلبات طاقته وقدرته على تثبيت النتروجين، فعندما يحتاج هذا البكتير إلى الحصول على طاقته من أكسدة حديد الحديدوز،فيجب عليه استخدام الأكسجين كمتقبل نهائى للإلكترونات المزالة من أيون المعدن، وعلى الرغم من أنه غالباً ما يخمد نشاط بروتينات الـ nif بسرعة بسبب الأكسجين، فلا يمكن أن تعمل نظم تثبيت النتروجين إلا وهى محمية منه، وأوضحت السيدة ماكنتوش أن الـ T.ferrooxidans برغم ذلك، يمكنها أن تثبت النتروجين الجوى باستخدام حديد الحديدوز كمصدر للطاقة، وكان يجب توفير الأكسجين بتركيزات محدودة ،تكفى للسماح بقدر من الأكسجين لأكسدة الحديد للمساعدة على تثبيت النتروجين،ولكن بقدر غير كاف لإخماد الإنزيمات المثبتة للنتروجين، ولا تزال هناك دراسات جارية لتوضيح الآلية التى يحل بها الـ T.ferrooxidans متطلباته المتناقضة ظاهرياً،من وجود الأكسجين لتوليد الطاقة،وغياب الأكسجين لتثبيت النتروجين.

ولا تزال هناك دراسات جارية عن الوراثة الجزيئية للأنواع الأخرى من جنس العصيات الكبريتية، وبالرغم من أن هذه الأبحاث فى مرحلتها الأولى من التطور عن تلك الأبحاث التى أجريت علىT.ferrooxidans،إلا أنها تعتبر الأساس لنظام وراثى للعديد من البكتيريا الموجودة، وكما ذكرنا من قبل،فقد أوضح الباحثون إمكانية النقل بطريقة الاقتران للبلازميدات بين أنواع أ.كولاى

والعصيات الكبريتية،التى تشمل علىT.novellus ، بالإضافة إلى ذلك، اســتطاع
ـسول يانكوفسكى وزملاؤه فى جامعة تل أبيب، أن يعيدوا طفرات معينــة مــن
T.thioparus إلى حالتها الطبيعية بتحويلها بواسطة د.ن.أ من بكتير نوع برى.
وفى النهاية، استخدمت آن سمرز ومشــاركوها فــى جامعــة جورجيــا فــى
أثينا،الجينــات الناقلــةtransposons لتخليــق طــافرات مــن T.novellus
وT.versutus.(الترانسبوزونات هى قطع من د.ن.أ،تستطيع إدخال نفســها فــى
المادة الوراثية الخلوية.وإذا ما اعترضها جين،فتستطيع أن تدمر وظيفته)

الخـــلاصـــة

هناك قدر كبير من التقدم قد تحقق فى تطوير أسلوب الاستغلال الوراثى لبكتير T.ferrooxidans على مدى السنوات القليلة الماضية، وقد تم عزل البلازميدات من ذلك البكتير،والتى قد تستخدم كمتجهات لنقل جينات جديدة إلى الخلايا البكتيرية، بالإضافة إلى ذلك،فقد اتضح أن جين T.ferrooxidans قد تم تعبيره فى أ.كولاى،وهو دليل على أن تسلسلات التحكم الجينى لأحد الأنواع،يمكن التعرف عليها بواسطة تسلسلات التحكم الجينى لنوع آخر، ومع ذلك،فهناك احتياج إلى وسيلة لإدخال متجه د.ن.أ فى خلايا T.ferrooxidans،بالرغم من أن بعض الخطوات قد تحققت فى هذا الشأن.

وسوف ينتج عن تطبيق تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم والأساليب الوراثية المصاحبة فى T.ferrooxidans والبكتيريا المشابهة لها،فهم أفضل للبيولوجيا الجزيئية للكائنات العضوية، وعلى سبيل المثال،سوف يتيح تولد طافرات جديدة فرصة الأبحاث فى وراثة وتنظيم أكسدة الحديد والكبريت، ويمكن أن يكون لاختبار قدرة الـ T.ferrooxidans على استخدام حديد الحديديك، بدلاً من الأكسجين، كمتقبل للإلكترون عندما تختزل الأكسدة مركبات الكبريت، نتائج عملية مفيدة، وقد يحسن تعزيز هذه القدرة من أداء الـ T.ferrooxidans فى عمليات الاستخلاص ،عندما يكون الأكسجين غير متوفر بقدر كاف.

وإحدى مميزات تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم،هى إمكانية استخدامها فى إدخال نسخ متكررة من جين معين إلى الخلايا، وقد يتيح تكبير هذا الجين التعرف على الإنزيمات التى تعمل "كعنق زجاجة" أيضى، وسوف تقدم هذه

المعرفة فكراً جديداً عن كيفىة تحسين معـــدل نمـــو البكتيريـــا ودورهـــا فـــى الاستخلاص، وهناك تطبيق آخر محتمل لتكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعـــم لـــه أهمية عملية ويتعلق بتحسين مقاومـــةT.ferrooxidans لمعـــادن ثقيلـــة معينـــة والمعوقات الأيونية الأخرى الموجودة فى بيئة الاستخلاص .

وهناك اعتبـــار مهـــم آخر،يتعلـــق بتطـــوير الســـلالات المعدلـــة وراثيـــاً منT.ferrooxidans،وهو توزيع الكائن العضوى الموجود فى البيئة، حيث تميل كتلة خام معينة لأن تتوحد مع سلالة طبيعية،تكيفت بطريقة خاصة للتعامل مـــع هذا الخام،فأى سلالة أخرى متغيرة وراثياً من مصدر آخر،قد لا تستطيع منافسة البكتيريا الموجودة، وقد من يكون من الضرورى نتيجة لذلك، أن يستغل العزل المحلى وراثياً،من أجل إنتاج سلالة مناسبة لكتلة خام معينة.

الفصل الثامن

البكتيريا والبيئة
Bacteria and the environment

كما أوضحنا فى الفصول العديدة السابقة، أن الكائنات المجهرية تحظى بقدرات تخليقية وهدميه رائعة،والتى أصبحت بصورة متزايدة مهمة فى مجال التكنولوجيا الحيوية. وسوف تتطلب بعض التطبيقات التى يجرى تطويرها حاليا إطلاق الميكروبات فى البيئة. وتشمل هذه التطبيقات على استخدام البكتيريا أو الفيروسات فى مكافحة الآفات الحشرية. بالإضافة إلى ذلك،تستطيع البكتيريا هدم المخلفات والمواد السامة،ولذا فلديها القدرة على تنظيف السوائل الكيميائية وصور التلوث الأخرى. وتوجد تطبيقات للبكتيريا حتى فى مجال التعدين،حيث تستطيع بعض الكائنات العضوية أن تستخلص المعادن المهمة من الخامات منخفضة المرتبة،والتى يكون استخلاصها بالطرق العادية غير مجد اقتصاديا.

والعديد من الكائنات المجهرية المستخدمة فى هذه التطبيقات يجرى تعديلها وراثيا بواسطة طرق الـــ د.ن.أ المطعم. وعلى سبيل المثال،يمكن إكساب البكتيريا قدرات هدم كيميائية جديدة، عن طريق إدخال جينات لتلك الكائنات المجهرية من أجل تخليق الإنزيمات التى تقوم بتحفيز التفاعلات المطلوبة. ويثير أى إطلاق متأن لكائن عضويا فى بيئة جديدة ردود فعل، فيما إذا كان إطلاق هذا الكائن سيحدث أضرارا بيئية ،بينما تتطلب الإطلاقات المقترحة للميكروبات المعدلة وراثيا تقييم واعى بشكل خاص.

تحتوى البيئات الطبيعية على سكانها الطبيعيين من الكائنات المجهرية،التى تشمل على البكتيريا والخميرة والفطريات. وعلاوة على ذلك،تلعب هذه

الميكروبات دورا هاما فى دورة الكربون،حيث تقوم بهدم النباتات الميتة والمادة العضوية وإطلاق ثانى أكسيد الكربون والمواد الغذائية الأخرى التـــى يســـتطيع النبات استخدامها فى تخليق مواد عضوية جديدة. وتعتبر الكائنات المجهرية التى تعيش فى التربة مهمة أيضا فى الإسهام فـــى دورة النتـــروجين. وتقـــوم هـــذه الكائنات المجهرية من بين مهام أخرى بتثبيت النتروجين،حيث تستمد النتروجين الخامل من الجو وتحوله إلى صور يحتاج إليها النبات.

وقد يؤدى إطلاق الكائنات العضوية المعدلة وراثيا إلى قلقلة ذلـــك النســـيج الرقيق للطبيعة ،أو يحتمل أن يؤدى إلى ظهور كائنات لها ليست لديها الفاعليـــة لمقاومة الحشرات أو يكون لها آثار ضارة على الحيـــوان والنبـــات ،وخاصـــة المحاصيل النباتية. وعلى ذلك،فالسمة الأساسية لتلك الإطلاقات المقترحـــة،يجب أن تتضمن تقييم واع للتأثير الذى قد تحدثه هذه الميكروبات على البيئة وصـــحة الإنسان.

إنتاج عوامل لمكافحة الآفات الميكروبية

Agents for microbial pest control

خلال العقود العديدة الماضية، أنقذ استخدام المواد الكيميائية العضوية التخليقيـــة فى صورة منظومة عريضة من مبيدات الحشرات حياة الملايين مـــن الأرواح وإلا فكانت ستموت بسبب الأمراض المتوطنة فى حشرات ،مثل الملاريا. وقـــد أسهمت المواد الكيميائية أيضا فى الزيادة الكبيرة فى إنتاجية المزارع التى كانت موجودة فى تلك الفترة. ومع ذلك،فقد كان ثمن هذا التحسن فى نوعيـــة الحيـــاة فادحا، و يتضح أثره إلا خلال العقدين الماضيين.

أصبحت المخلفات السامة التى نجمت عن تلك المبيدات الحشـــرية التخليقيـــة ملوثات بيئية ذات تأثيرات ضارة على الحياة البرية،التى اشتملت على الطيـــور

وبعض الحشرات المفيدة من النحل ، ومن الممكن تصور أيضا أنهـا ألحقـت ضررا بصحة الإنسان ، وعلاوة على ذلك ، فقد شجع الاستخدام المستمر لبعض لمبيدات الحشرية على ظهور بعض الأنواع من الآفات اكتسبت مقاومة ، ولـم تعد تفلح معها المواد الكيميائية . وعلى سبيل المثال ، أصبح البعوض الحامـل لمرض الملاريا فى أجزاء عديدة من العالم مقاوما للمبيد الحشـرى مـن مـادة DDT (dichlorodiplhenyl trichhoroethmer) ، التى ظلـت لسـنوات المادة المفضلة للقضاء على هذه الآفة .

وبسب تلك المشاكل المتعلقة بالآثار السامة والآفات المقاومة ، فقد حظـر إنتاج العديد من المبيدات الحشرية فى الولايات المتحدة ، أو استخدم فى بعـض الحالات الضرورية بعد مراجعة حكومية صارمة . وينطبق الإجـراء الأخيـر على مبيدات الآفات دائمة المعالجة بالكلور ، مثل مادة هيبتا كلور heptachlor التى كانت تستخدم فى التخلص من النمل الأبيض الموجـود أسـفل أساسـات المبانى .

ولهذه الأسباب وأسباب أخرى اهتمت الجهات الحكومية والأكاديميـة وعلمـاء الصـناعة لفـتـرة من الزمـن بالبحـث عن وسيلـــة لمكافحـــة الآفــات بوساطة عوامل بيولوجيـة وطبيعـية ، ويمكــن القيـام بهـذا بواحــدة مــن الطـرق العـديـدة ، ومن بينها إطلاق ذكور حشرات عقيمة للتزاوج بـدون تناسل مع إناث أنواع من الآفات ، واسـتخدام الفيرمونـات[1] pheromones لإفساد نظام الحشرة الغذائى أو سلوكها التناسلى .

---

(١) الفيرمون : مادة كيميائية يفرزها الحيوان ، يكون لها تأثير محدد على عضو اخر من نفس النوع مثل التزاوج أو الهجوم ، وتوجد الفيرمونات فى الحشرات ، وتوجد أيضا فى القوارض ، والقرود . (المترجم) .

وهناك مجال بحثى آخر يظهر أن له دلائل واعدة كبيرة فى المكافحة البيولوجية للآفات ، هو استخدام الكائنات المجهرية التى لديها قدرات طبيعية على إنتاج السموم ، وخصوصا تلك التى تقتل حشرات معينة ، وتعد المكافحة الميكروبية فى الحشرات من الاهتمامات الجذابة ، لأن الميكروبات بصفة عامة سلسلة عوائل محدودة تماما ، ونتيجة لذلك ، فإنها لا تؤثر إلا على أنواع معينة من الحشرات فى موقع معين دون أن تحدث تدميرا شاملا للحشرات المفيدة وكذلك الحشرات الضارة ، وعلاوة على ذلك ، فمن خلال الحالات التى تم دراستها حتى الآن ، فإن تطوير مقاومة الحشرات الممرضة يحدث على فترات قصيرة أقل من تطوير مقاومة للمبيدات الحشرية الكيميائية التخليقية ، وفى النهاية ، أن يحدث تكون للمخلفات السامة فى البيئة .

عصية ثرنجسيس

Bacillus thuringensis

هناك ما يزيد على ١٥٠٠ عامل أو منتج مكافحة بيولوجى ، ربما يكون لها إمكانية التطور التجارى ، اثنان من أكثر العوامل التى أجريت عليهما دراسات مكثفة واختبرا فى الحقل هما : عصية ثرنجسيس Bacillus thuringensis والفيروسات من عائلة Baculoviridae .

وعلى مدى الثلاثين عاما التى استخدم فيها البكتير Bacillus thuringensis فى المكافحة البيولوجية للآفات ، ظهر أن هناك ثلاثين نوعا مختلفا لها نشاط مبيد للآفات ضد ما يزيد على مائة نوع من الحشرات من الرتب البيولوجية لحرشفيات الأجنحة [٢] Lepidoptera وذوات الجناحين Diptera ٣ . وتشمل الرتبة

---

(٢) حرشفيات الأجنحة : رتبة الفراش من الحشرات . من فصائلها الفراشيات والدوديات والزحليات والذارعات والقائلات إلخ .

لأخيرة كل البعوض المتغذى بالترشيح تقريبا والذبابة السوداء. وأصبح ستخدامBacillus thuringensis فى مقاومة البعوض من التطبيقات القياسية،وتنتج شركات فى الولايات المتحدة والصين وإسرائيل والهند ونيجيريا كميات كبيرة من هذا الكائن العضوى على المستوى التجارى .

ويعد استخدام هذا الميكروب بسيطا نسبيا، لأنه يكون بوغات يمكن أن تنتشر فى خليط الماء، وتطبق فى الأماكن المطلوب معالجتها. وعند فحص البوغات ذات المظهر البلورى تحت الميكروسكوب،تظهر أنها تحتوى على سموم بروتينية. وعندما تتغذى يرقات الحشرة على بلورات البوغات،تطلق سم يسمى بـ delta-endotoxin، يعمل على تدمير أغشية الخلايا المبطنة لجدار معدة اليرقة. ومفعول السم سريع جدا،حيث تدمر يرقات البعوض بعد هضم بلورات البوغ فى غضون دقائق.

وقد أجريت العديد من التجارب الحقلية على acillus thuringensis،وأظهرت أنها تسبب نقص هائل فى أعداد يرقات البعوض. ومع ذلك،فالتطبيقات المتكررة مطلوبة بصفة عامة لمقاومة نشاط اليرقات الآفية . وقد يمكن التغلب على هذه المشكلة باستخدام أساليب الـــ د.ن.أ المطعم لنقل جينات Bacillus thuringensis السامة إلى كائنات مجهرية أخرى لها قدرة أفضل على مقاومة ما يشكل بيئات معادية،مثل البحيرات التى يعيش فوقها البعوض. وقد استنسخ جين delta—endotoxin فى البكتير أ.كولاى. بالإضافة إلى ذلك،استنسخ تيرى جراهام وليديا واترد من مؤسسة مونسانتو فى سانت لويس بولاية ميسورى هذا الجين فى بكتيرPseudomonas fluorescens الذى يعيش على جذور – النباتات.

وتقوم وكالة حماية البيئة الأمريكيةEPA بمراجعة التطبيقات لإجراء التجارب الحقلية على هذه الكائنات المجهرية المهندسة وراثيا. وقد ووفق على الكائن العضويB.thuringensis بشكل عام على أنه الكائن العضوى الأكثر أمانا حتى

الآن ،الذى يطور من أجل مكافحة اليرقات البعوضية. وسواء كانت مبيدات الآفات الميكروبية المهندسة وراثيا مبيدات آمنة وفعالة، فإن ذلك من المسائل التى ستخضع للدراسة المكثفة.

الفيروس العصوى
Baculovirus

وهناك عددا من الفيروسات لها أيضا القدرة على العدوى وتفتك بأنواع معينة من الآفات الحشرية،إما يجرى استخدامها،أو تم وضعها فى الاعتبار لكى تستخدم كعوامل مكافحة بيولوجية. ومن بين هذه الفيروسات، الفيروسات التى تنتمى لعائلة**Baculoviridae** ، والتى تعتبر ذات فاعلية شديدة فى مكافحة بعض الآفات مثل دودة حب القطن وفراشة**Douglas fir tussock** والقزحية الإسفنجية.

والفيروسات العصوية مثل **B.thuringiensis** ،لا تصيب إلا أنواعا معينة من الحشرات،وهى نشطة جدا كمبيدات حشرية. بالإضافة إلى ذلك ،يمكن استخدام هذه الفيروسات بسهولة ولها فترة تخزين**shelf-life** طويلة.

وتستخدم الجزيئات الفيروسية عادة فى مخلوط أساسه مائى وترش على أوراق النبات المطلوب حمايتها،وعندما تأكل الحشرات أوراق النبات المحتوية على الفيروس،فإن الجزيئات الفيروسية تصيب جدار المعدة. ويتناسل الفيروس هناك وينتشر بعد ذلك فى أجزاء النسيج الأخرى، ومن ثم يحدث العدوى لأجهزة الحشرة ويفتك بها . ويمكن أن تنتشر جثة الحشرة المثقلة بالجزيئات الفيروسية الحية فى حشرات أخرى.

وأظهرت الدراسات التى أجريت على**B.thrungiensis** والعوامل البيولوجية الأخرى إمكانية القضاء على العديد من الآفات الحشرية. وقد تتحسن الجدوى الاقتصادية للمكافحة البيولوجية فى حالة ما تستخدم الهندسة الوراثية فى إنتاج

عوامل ميكروبية أو فيروسية،تعزز المقاومة للضغوط الطبيعية التى ستظهر فى الحقل. وتشمل هذه الضغوط التعرض للجفاف والحرارة والبرد والأشعة فوق البنفسجية القادمة من الشمس. بالإضافة إلى ذلك،سوف تجعل المعالجة الوراثية التى توسعت فى سلسة حاضنات من عوامل المكافحة الميكروبية أكثر جاذبية من وجهة النظر التجارية.

وتهتم الأبحاث الجارية أيضا بإنتاج عوامل مقاومة أكثر اقتصادا وتفى بمتطلبات التنظيمات الحكومية المتعلقة بالتأثير المحتمل لإطلاق العوامل فى البيئة. ونتائج الدراسات المكثفة لتقييم مخاطر إطلاق الكائنات المهندسة وراثيا فى الحقل وشيكة الصدور. والهدف من ذلك هو الحفاظ على الفوائد التى تم الحصول عليها من خلال سلسلة مبيدات الآفات العضوية،وفى نفس الوقت تقلل أو تزيل ترسب المخلفات السامة والمشاكل البيئية المحتملة الأخرى .

الاستخدامات الزراعية للكائنات العضوية المعدلة وراثيا

Agricultural uses of genetically altered organisms

أظهرت تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم آمالا عظيمة فى التطبيقات الزراعية الأخرى، بالإضافة إلى إنتاج مبيدات الآفات والبكتيريا المهندسة وراثيا. وتتضمن أحد المنتجات الأخيرة،استخدام ميكروبا مهندسا وراثيا لحماية المحاصيل النباتية ضد ضرر الصقيع.

ويعيش البكتير الشائع **Pseudomonas syringae** على سطوح العديد من الأنواع النباتية،ويحتوى على بروتين فى غشاء خليته، يجعل الماء يكون بلورات ثلجية عند درجة حرارة عالية نسبيا تصل ما بين صفر و ٢درجة مئوية،ولذلك يسبب للنبات ضرر الصقيع . وفى غياب هذه العوامل المنوية للثلج،لا تظهر على

النباتات أضرار الصقيع إلا عندما تصل درجة الحرارة ما بين ٢و٨ درجات مئوية تحت الصفر.

وباستخدام أساليب الهندسة الوراثية،استطاع ستيفن لندو وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا فى باركلى أن يزيل الجين المشفر عن البروتين المنوى للثلج من كروموسوم البكتير **Pseudomonas syringae**. والمتوقع من هذا ،هو أنه عند رش النبات أو البذور بالبكتير المهندس وراثيا والمنزوع منه الجين المسبب للصقيع،سيجعل هذا البكتير يستعمر سطوح النباتات قبل أن تستعمرها السلالات الطبيعية المسببة للصقيع،وبالتالى يجعل النباتات مقاومة بدرجة أكبر للصقيع.

وتوجد أيضا العوازل الطبيعية من بكتير **Pseudomonas syringae** المفتقرة بصورة طبيعية إلى الجين الذى ينتج البروتين المَنَوّى للثلج ،كطافرات سلبية الثلج،والتى أنتجت فى المعمل بطرق تقليدية دون الاستعانة بتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم. وقد تستخدم هذه البكتيريا بنفس الطريقة التى تستخدم بها الأنواع المهندسة وراثيا. ومع ذلك، لما كانت التغيرات الدقيقة التى حدثت لم تعرف إلا للبكتيريا التى نتجت من تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم،فيعتقد أن يكون لهذه السلالات الخطر الأقل المصاحب لإطلاقها فى البيئة.

وسوف تجرى مجموعة باركلى وعلماء من وكالة حماية البيئة الأمريكية تجارب حقلية على سلالات من البكتير **Pseudomonas syringae** المهندس وراثيا السالب الصقيع فى موقع فى شمال كاليفورنيا فى ظل ظروف تجريبية محكمة الدقة. وتهدف التجربة إلى تقييم فعالية البكتير فى جعل النبات أكثر مقاومة للصقيع،وتأثيراته البيئية المحتملة، وإجراءات مراقبة البكتير بعد إطلاقه.

ولا تقتصر تطبيقات تكنولوجيا الـ د.ن.

زراقية. وهناك مجال مثير بصفة خاصة في الأبحاث الزراعية، يتضمن لمعالجة الوراثية للمحاصيل النباتية(أنظر الفصل الحادى عشر). وبدأ الباحثون من خلال إدخال جينات جديدة إلى النباتات تطوير سلالات محسنة تقاوم البكتيريا الحاملة للأمراض، والفيروسات، ومبيدات الحشائش.

دورة الكربون التى تقوم بها الكائنات المجهرية

Carbon-cycling by microorganism

دون تكرار دوران الأنشطة التى تقوم بها البكتيريا والخميرة والفطريات،فيمكن لعناصر مهمة بيولوجيا مثل الكربون والنتروجين والكبريت أن تتوقف تماما داخل المادة العضوية. فتصور ما يحدث على سبيل المثال، إن لم تقم الكائنات المجهرية بهدم المادة العضوية فى الأوراق المتساقطة فى فصل الخريف من كل عام،وتترك هذه الأوراق تتساقط على أرض الغابة إلى الأبد.

وللميكروبات مواهب متعددة لا متناهية من خلال التفاعلات التى يمكن أن تقوم بها فى هدم المركبات العضوية. فالمسارات الإنزيمية التى نشأت منذ ملايين السنين تتيح للكائنات المجهرية استخدام سلسلة كبيرة من المركبات التى تمدها بالطاقة والوحدات البنائية التى تحتاجها لتخليق المكونات الخلوية. وأظهرت الدراسات التى أجريت على المسارات الإنزيمية بصفة عامة،أن المركبات ذات التركيبات الكيميائية المتشابهة وحدات بنائية خلوية، تشمل على الأحماض الأمينية والسكريات،تقوم على هدمها مسارات إنزيمية أقصر من المسارات الإنزيمية المطلوبة لهدم المركبات الأكثر تعقد،والتى غالبا ما تتطلب خطوات عديدة لإكمال عملية هدم المواد العضوية.

مصادر المركبات التخليقية فى الطبيعة
Sources of synthetic compounds in nature

تعرضت الكائنات المجهرية طوال العقود العديدة الأخيرة لآلاف من المركبات العضوية الجديدة التى صنعها الإنسان. وقد استخدمت هذه المركبات التى تتحدى حتى القدرات الهدمية المتعددة للميكروبات فى الزراعة والصناعة والمخلفات الآدمية. وقد ترش هذه المركبات إما على غير توقع أو تلقى بكميات كبيرة بطريقة متأنية . وتنقسم المواد الكيميائية إلى فئات مختلفة،تشمل مبيدات الفطريات ومبيدات الآفات ،والملدنات، والمذيبات، والمنظفات، ومثبطات اللهب والمبردات–وأعدادها آخذة فى التزايد.

وتقوم الطائفة الميكروبية بهدم بعض من هذه المركبات العضوية التخليقية،ولا تشكل أية تهديدات بيئية. وتتحلل هذه المركبات التخليقية لأنها مشابهة للمركبات الطبيعية، ونتيجة لذلك يمكن أن تؤثر عليها الإنزيمات الميكروبية السابقة الوجود. ومع ذلك،توجد مجموعة أخرى من المركبات التخليقية أقل تأثرا بالهجوم الميكروبى وتدوم لفترات طويلة فى الطبيعة. وعلى ذلك،فلهذه العوامل إمكانية إحداث مشاكل تلوث خطيرة.

فحتى المركبات التى تحللت بالفعل فى بعض الظروف البيئية، تدوم لفترة طويلة فى أماكن أخرى. وعلى سبيل المثال،يختفى عادة المبيد الحشرى السام باراثيون parathion من التربة فى غضون شهر من استخدامه، بينما يظل هذا المبيد فى ظروف ملاءمة لأكثر من ستة عشر عاما من بعد آخر مرة استخدم فيها . وقد يعكس هذا الدوام الطويل للمبيد غياب الميكروبات الهادمة الأساسية من التربة،كنتيجة لغياب بعض الظروف الكيميائية الحيوية أو البيئية التى تؤخر نموها.

الأيض [1] الميكروبى للمركبات المهلجنة

Microbial metabolism of halogenated compounds

المركبات التحليفية المحتوية على الهيالوجينات (عناصر البروم أو الكلور أو الفلور أو اليود) هى السبب فى التلوث السام فى عدة مواقع نفايات خطرة . ولا تستطيع الكائنات المجهرية أن تهدم العديد من هذه المركبات المستخدمة على نطاق واسع . وتنتمى مادة DDT إلى هذه الفئة ، وعلى الرغم من تناقص استخدامها بدرجة كبيرة منذ عام ١٩٧٥ ، فلا تزال توجد فى التربة فى عديد من المناطق . ومادة الـ Polychlorinated biphenyls والتى تختصر إلى (PCBs) ، والمستخدمة كمادة عازلة فى الأجهزة الكهربية ، ومذيب التنظيف الجاف الكربونى تتراكلوريدا tetrachloride ، يعتبران أيضا من أشهر المركبات العضوية المهلجنة .

إلا أن وجود المركبات الهالو - عضوية ، ليست غلطة مسئول عنها الإنسان وحده . فقد تم التعرف على ما يزيد عن ٢٠٠ منتج طبيعى مهلجن . ويحتوى حوالى ٧٥% من هذه المركبات على الكلور ، وقد نشأ العديد منها فى مياه المحيطات المالحة . ووجود هذه المركبات الكيميائية الطبيعية المهلجنة هو دليل على أنه قد تكون للكائنات المجهرية إنزيمات لهدم هذه المركبات - وقد تستخدم قدرات هذه الكائنات المجهرية فى مكافحة التلوث البيئى الناجم من المواد الكيميائية التى صنعها الإنسان بنفسه .

وبصفة عامة ، هناك نوعان من الهدم الميكروبى . الأول ، تتحلل المركبات للمساعدة على نمو كائن عضوى وإمداده بالمواد الغذائية الأساسية ، مثل الكربون والنتروجين أو الكبريت . والثانى من الأبيض ، الذى يعرف بالأبيض المختلط cometabolism ، لا تستخدم المركبات فى المساعدة على نمو الكائن العضوى، ولا تستخدم كمصادر غذائية ، والأيض المختلط بصفة عامة النتيجة التصادفية للنقص المطلق لتخصص الركيزة من قبل الإنزيمات الميكروبية . وهناك مركبات غير

---

(١) الأيض (عن مجمع مصر ، وقد شاعت عند أساتذة النبات ، وفى اللسان عن الليث : هو صيرورة الشىء شيئا غيره ، وهى أصلح من التحول المستعملة لمعان أخرى والإنجليزية من اليونانية بمعنى الأيض أى التحول والتبدل جملة التبدلات فى المادة والقوة التى تحصل فى التعضيات منذ ولادتها حتى موتها ، ويكاد الأيض يكون مرادفا لوظائف التغذية وله طوران أو اتجاهان: إيجابى ويسمى الأيض البنائى anabolism وسلى ويسمى الأيض الهدمى catabolism معجم المصطلحات الزراعية للشهابى ١٩٨٨ ، المترجم .

طبيعية معينة ،مثل المواد الكيميائية الهالو-عضوية قد تشـبه ركيـزة الإنـزيم الطبيعية بصورة فعالة فى القيام بنفس التفاعل الإنزيمى. والمركبـات التـى لا تشابه أى من المواد الخام الطبيعية،ستكون مقاومـة للهـدم الميكروبـى،إلا إذا تغيرت بواسطة الضوء أو الماء أو العوامل البيئية،بطريقـة تجعلهـا خاضـعة للإنزيمات الميكروبية.

تحسين الهدم الميكروبى بواسطة الهندسة الوراثية

Improving microbial degradation by genetic engineering

على الرغم من قيام الباحثون بعزل الكائنات المجهرية التـى يمكنهـا هـدم المركبات العضوية المهلجنة،إلا أنه غالبا ما يكون للميكروبات نشاطا محـدودا. وعلى سبيل المثال، فقد تم التعرف على سلالة من الزوائف **Pseudomonas** التـى يمكنها هدم حمض **٣-chlorobenzoic** ، بينما لا تستطيع هـدم مركبـات-**٤-chloro** وأحماض **٣،٥-dichlorobenzoic** ذات الصلة الوثيقة به.

وهنـاك سـلالة أخـرى مـن **Pseudomonas** يمكنهـا هـدم حمـض-**٢،٤-diclorophenoxyacetic** ،لكنهـا لا تسـتطيع التـأثير علـى حمـض-**٢،٤،٥-trichlorophenoxyacetic** الذى يختلف عن الحمض السابق فى أنه يحمل ذرة كلور ثالثة فى الجزيء. وقد استخدم كلا من هذين المركبين على نطاق واسع كمبيدات للحشائش،وظل المبيد **٢،٤،٥-trichlorophenoxyacetic** موجود فى البيئة.

وتطبيق الطرق الوراثية الجديدة فى إنشاء سلالات ميكروبيـة حديثـة ذات قدرات محسنة لهدم المركبات التخليقية العديدة، يعـد مـن مجـالات البحـث الجارية.وعلى الرغم من ذلك،فقبل التمكن من إنشاء مثل هذه السلالات، يجـب على الباحث أن يجيب عن سؤال" لماذا لا تتهدم المواد الكيميائية السامة بصورة طبيعية؟ والإجابة عن هذا السؤال ،يتطلب معرفة مفصلة عن المسـارات التـى

تهدم المركبات المرتبطة بصورة تركيبية ،والتى تتضمن على فهـم نوعيـات الإنزيمات وتنظيمها.

وقد لا تستطيع الميكروبات القيام بهدم كامل لمركب معين لعدة أسباب. فقد لا يكون لدى الكائنات كل الإنزيمات المطلوبة للهدم،أو قد تكون موجـودة لكنهـا بطيئة التأثير تماما. ويمكن حل هذه المسائل عن طريق إدخال جينات جديدة فى الكائن العضوى ،يمكنها أن تشفر عن الإنزيمات ذات التخصصات المرغوبـة. وهناك اختيار آخر،وهو إدخال الطافرات فى جين مناسب داخل الميكروب مـن أجل تغيير تخصصية الإنزيم،لتتيح له فرصة التعرف على الركيزة المرغوبـة. وإذا كانت المشكلة تنحصر فى بطيء المسار الهدمى،فقد يكون الحل هو زيـادة مقدار الإنزيمات المنتجة عن طريق استنساخ الجينات المماثلة فـى بلازميـد، يكون موجود بنسخ متكررة داخل الخلية.

وهناك تفسير آخر محتمل للقصور فى هدم مادة كيميائية،هو الفشـل فـى الوصول إلى الخلية الميكروبية. وقد يمكن التغلب على هذه المشكلة عن طريق إدخال طفرات جينية إلى نظام ناقل موجود لزيادة سلسلة تخصصه لكى تشـمل على المادة الكيميائية المطلوب هدمها. وأخيرا،فقد ينظم تخليق الإنزيمات الهادمة بطريقة محكمة،بحيث يتوقف نشاطها بصـورة طبيعيـة ولا تنشـطها المـادة الكيميائية الجارى هدمها. وفى هذه الحالة،سيكون الحل هو اختيـار الطـافرات النظامية التى تنتج الإنزيمات المرغوبة دون الحاجة إلى تنشيط معين للجينات. وهناك طرق متوفرة للقيام بكل هذه المعالجات التى ذكرناها سابقا.

وقد بيّن والتر رينكى وهانز ناكمس من جامعة**Gesamthochschule** فى وبرتال بألمانيا،أن من الممكن إنشاء مسارات كاملة للهدم الكيميائى،عن طريـق ضـم القدرات الوراثية لسلستين بكتيريتين. وتحمل الجينات المطلوبة لإجـراء هـدم

المواد الكيميائية التخليقية بصورة طبيعية على بلازميدات،بدلا من حملها في د.ن.أ كروموسوى. وعلى سبيل المثال،فالجينات التى تسمح للسلالة المذكورة سابقا من Pseudomonas التى تهدم حمض ٣-chlorobenzoic بدلا من ٤-chloro- أو أحماض ٣،٥-dichlorobenzoic واقعة على بلازميد.

ويمكن أن تنتقل البلازميدات بسهولة بين أنواع Pseudomonas. واستطاع رينكى وناكمس أن يدخلا بلازميد ثان يسمى بلازميد TOL،في سلالة Pseudomonas لديها المقدرة على هدم حمض ٣-chlorobenzoic، من أنواع Pseudomonas أخرى. ويحمل بلازميد TOL جينات تشفر عن إنزيمات تسمح بتحويل أحماض ٣-chloro- و ٤-chloro- و ٣،٥-dichlorobenzoic إلى الكاتكولات catechols* المهلجنة المناظرة. ويستطيع البكتير الناتج أن يهدم تماما كلا من الحمضين البنزويكيين أحاديا الهلجنة(شكل ٨-١).

وبتربية هذه السلالة فى وجود حمض ٣,٥-dichlorobenzoic ، سمحت حينئذ بعزل طافر يمكن أن يهدم كل أحماض البنزويك الثلاثة. ولا تتطلب هذه المعالجة استخدام أساليب الـ د.ن.أ المطعم ،بشكل عرضى،لكنها أظهرت أنه يمكن استغلال الإجراءات الوراثية البسيطة فى تطوير سلالات بكتيرية جديدة من خلال تطور اضطرارى.

وباستخدام إجراء مختلف،استطاعت أنادا شاكرابرتى وزملاؤها فى المركز الطبى بجامعة شيكاغو فى ولاية شيكاغو أن يعزلوا سلالة من Pseudomonas cepacia تستطيع أن تهدم ٢،٤،٥-trichlorophenoxyacetic.وتعتبر تركيبات الـ د.ن.أ لبعض البلازميدات الموجودة بصورة طبيعية والتى تسهم فى هدم

* الكاتكول :أحد المشتقات البلورية اللالونية من البنزين،التى تستخدم أساسا فى التصوير والصباغة،وكمادة كاشفة،ويسمى أيضا بيروكاتكول. المترجم

لمركبات العطرية متشابهة تماما،ذلك الاكتشاف الذى يوحى بأن البلازميدات مرتبطة بشكل تطورى. والافتراض الحالى بأن البلازميدات ذات الوظائف الوراثية الجديدة ربما تكون قد نشأت من أصل مشترك بطرق غير مفهومة،ولكن من المحتمل أن تكون قد اشتملت على تطعيمات بين الجينات البلازميدية وجينات الإلغاء والطفرات. ونتيجة لذلك،فبإضافة بلازميدات جديدة لتلك البلازميدات الموجودة بالفعل فى البكتريا الأصيلة النشأة فى التربة الملوثة،قد يعطى تجمّع جينى مناسب لنشوء جينات جديدة،يستطيع أن يهدم الملوثات الكيميائية.

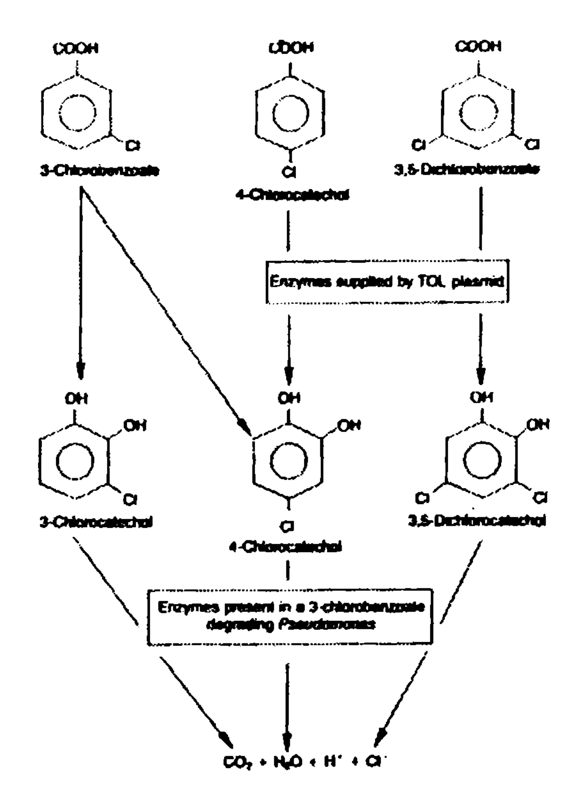
وحصلت شاكر إبرتى وزملاؤها على سلالة P.cepacia لها قدرة على هدم ٢،٤،٥-trichlorophenoxyacetic عن طريق خلط مزارع بكتيرية من مناطق ملوثة بمبيد الحشائش بسلالة بكتيرية معملية حاملة للبلازميد،ثم اختيار البكتيريا الهادمة لأحماض٢،٤،٥-trichlorophenoxyacetic. وتستطيع السلالة التى تم عزلها إزالة التلوث من التربة المحتوى على ٢٠٠٠٠جزء فى المليون من أحماض-٢،٤،٥ trichlorophenoxyacetic، وإعادة النمو الطبيعى للنبات.

ويعمل البكتير من خلال إطلاق الكلور من جزيء-٢،٤،٥ trichlorophenoxyacetic . وعلاوة على ذلك،فقد اتضح أن نزع النشاط الهالوجينى غير مجد ،لأن باستطاعة السلالة البكتيرية أيضا أن تطلق الهالوجينات من سلسلة متنوعة من أحماض الفينيك[٦] التى تحتوى على الكلور أوالبروم أو الفلور.

[٦] حمض الفينيك:جسم صلب متبلور ابرى الشكل حريف شديد الرائحة.يستعمل محلوله مطهرا ومضادا للطفيليات،ويطلق اسم حامض الفنيكcarbolic acid عادة على محلول هذه المادة-معجم الشهابى للمصطلحات الزراعية-المترجم.

وتعتمد مقاومة أى مركب للهدم في الجزء الأكبر منها على الهالوجينات أو المجموعات البديلة الأخرى الذى يحتوى عليها. وبإزالة هذه المجموعات من المركبات يعتبر عاملا مهما،لأنه سيولد مركبات يمكن أن تتهدم بنظم الإنزيمات سابقة الوجود. والتحدى الثانى،هو استنساخ الجين أو الجينات المطلوبة لنزع النشاط الهالوجينى من المتجهات التى يمكن إدخالها فى البكتيريا لتنتج حتى السلالات الأكثر فاعلية لهدم المواد الكيميائية الهالو-عضوية.

وعلى الرغم من أن لدى البكتيريا إمكانات كبيرة لهدم المواد الملوثة من البيئة،إلا أن التفاعلات التى تقوم بها الكائنات العضوية لا تنتج دائما مواد أقل سمية. وتكون بعض المنتجات أحيانا أكثر خطورة من المركبات الأصلية. فعلى سبيل المثال،تحول البكتيريا مادة الـ DDT فى بعض أنواع التربة والبيئات المائية إلى مادةDDD(dichlorodiphenyl-dichloroethane) التى تعتبر مبيدا أكثر فاعلية من المركب الأصلى،وتظل أيضا لفترة أطول فى البيئة،وتعتبر شديدة السمية بالنسبة للحيوانات الراقية.



شكل ٨-١ مسار الهجين للهدم الكامل للأحماض الكلوروبنزويكية،التى نشأت من نقل البلازميد. ويمكن أن تهدم سلالة أصلية من Pseudomonas حمض ٣-chlorobensoic تماما إلى ثانى أكسيد كربون وماء وهيدروجين وأيونات كلور. ومع ذلك ، لا تستطيع أن تهدم أحماض ٣،٥-dichlorobenzoic ،٤-chloro-and لأنها لا تستطيع أن تحولها إلى كاتكولات مناظرة لها،وهو التفاعل الذى يعتبر خطوة بينية فى مرحلة الهدم الكامل. وبإدخال بلازميد TOL إلى البكتير يمكن من التحول الكاتكولى للحمضين البنزويكيين،وبالتالى يساعد على هدمهما الكامل.

استخدام البكتيريا فى صناعة التعدين

The use of bacteria in the mining industry

تمتد إمكانات موائمة الميكروبات للقيام بوظائف مفيدة بصورة مدهشة إلى ما أبعد من التطبيقات الزراعية والدوائية . فالبكتيريا يجرى استخدامها بشكل تجارى فى صناعات تعدين النحاس واليورانيوم، وتقوم البكتيريا بتعدين أكثر من ١٠% من النحاس الذى تنتجه الولايات المتحدة(أنظر الفصل السابع).

ويعتمد التعدين البكتيرى على قدرة الميكروبات على أكسدة مركبات الخامات المعدنية غير القابلة للذوبان، لإنتاج مركبات قابلة للإذابة، بينما يمكن أن تستخدم البكتيريا بطريقة أكثر سلبية فى استخلاص المعادن من المحلول، حيث تحتوى جدران الخلايا البكتيرية على جزيئات سالبة الشحنة،تجعل منها مصايد ممتازة لتضم أيونات المعدن الموجبة إليها . ويحدث هذا "الامتصاص الحيوى" حتى مع الخلايا الميتة،ويعتبر ارتجاعيا،أى أن المعدن انتزاعه بسهولة من الكائنات العضوية.

ويمكن أن يخدم الامتصاص الحيوى هدفا مزدوجا، حيث يستخدم فى كلا من استخلاص أو تركيز المعادن المهمة من المخلفات الصناعية، وينقى هذه المخلفات من المعادن السامة.

ولا تعتبر البكتيريا هى الكائنات الوحيدة التى يمكن أن تستخدم بهذه الطريقة،حيث تحتوى جدران الخلايا الفطرية على مادة الكيتين[٧] التى تعتبر عديدة سكريات إنشائية،والتى تعتبر أيضا رابطا فعالا للمعادن. وقد طورت العمليات البكتيرية والفطرية تماما لمعالجة المخلفات فى مفاعلات القوى النووية واستخلاص المعادن الثمينة.

التأثير البيئى للكائنات المجهرية المهندسة وراثيا

The environmental impact of genetically engineered microorganisms

يعتمد استخدام الكائنات المجهرية فى المستقبل فى التطبيقات التى ذكرناها على مدى الإطلاق الآمن لتلك الكائنات فى البيئة. ويعتبر هذا من الموضوعات

[٧] مادة قرنية تدعم قشرة الحشرات والقشريات وتوجد أيضا لدى بعض الفطر والأشنات. معجم المصطلحات الزراعية للشهابى.المترجم

الجدلية وغالبا ما تصاحبه خلافات حادة. ففى حين كانت بعض الكائنات المجهرية التى أطلقت إلى البيئة آمنة، إلا أن البعض الآخر لم يكن آمنا بل خطيرا.

ويتوقف إنشاء كائن عضوى جديد فى نظام بيئى[8] على الظروف الفيزيائية والكيميائية الموجودة هناك،وعلى تفاعلات الكائن مع الأنواع المحلية. وسواء أكان الكائن العضوى المهندس وراثيا مفيدا أو غير مفيدا فى بيئة ايكولوجية معينة،فإن ذلك سيتوقف على مميزاته ،وعلى خصائص النظام البيئى المستقبل له.

وعندما يستوطن كائن غريب نظاما بيئيا جديدا،فقد تحدث أو لا تحدث تأثيرات ضارة،لكنه من المؤكد غالبا ما يحدث تغييرات من نوع معين. وقد تكون هذه التأثيرات غير محسوسة بحيث لا يمكن اكتشافها أو تكون مجتلبة للكوارث. وعلى سبيل المثال، كان لإدخال القزية الإسفنجية**gypsy moth** إلى الولايات المتحدة تأثيرات ضارة على أوراق النبات،لأن الحشرة ليست لها أحفاد طبيعيين فى أمريكا الشمالية. وراجع فرانسيس شاربلس من معمل أوك ريدج القومى فى أوك ريدج بولاية تينسى العديد من الأمثلة الأخرى للضرر البيئى الذى يسببه إطلاق كائنات عضوية جديدة.

ويمكن أن يؤثر كائن عضوى جديد على البنيئة، أما بطريقة مباشرة أو غير مباشرة.وتشمل التأثيرات المباشرة إحداث المرض أو التسمم لأنواع معينة أو طوائف الأنواع. وتهدف المعالجة الوراثية للعديد من الكائنات المجهرية بطريقة دقيقة إلى زيادة تأثيراتها السامة على أنواع الآفات فى البيئة. ومثل هذه الكائنات

[8] النظام البيئى هو النظام الناشئ من تفاعل مجتمع من الكائنات العضوية مع البيئة الموجودة بها.المترجم

المجهرية،بالرغم من أنها مصممة لأن يكون لها سلسلة محددة من العائل،إلا أنها تشكل مخاطر أيضا على الكائنات غير المستهدفة.

وتأتى التأثيرات غير المباشرة من التغييرات فى تركيب أو وظيفة طائفة كائنات محلية. فيمكن لأى كائن جديد أن يغير الطائفة تغيرا تركيبيا بعدة طرق. فقد يؤثر على سبيل المثال،من خلال افتراسه أو سيطرته على الأنواع الطبيعية من خلال مواردها الغذائية الأساسية. وقد استعرض دانيال سيمبرلوف من جامعة فلوريدا الحكومية بولاية تالاهاسى ٨٥٤ حالة،أدخلت فيها الكائنات العضوية إلى البيئة،ودرس تأثير الدخلاء الجدد على تكوين الطائفة المحلية. وعلى الرغم من تنوع تأثيرات الإدخال،إلا أن بعض البيئات عانت من نقص فى أعداد الأنواع. فقد أدت الطبيعة الافتراسية للدخلاء الجدد إلى فقد ٥٠ من هذه الحالات وإلى التعرض للهجوم من ٥١ حالة أخرى.

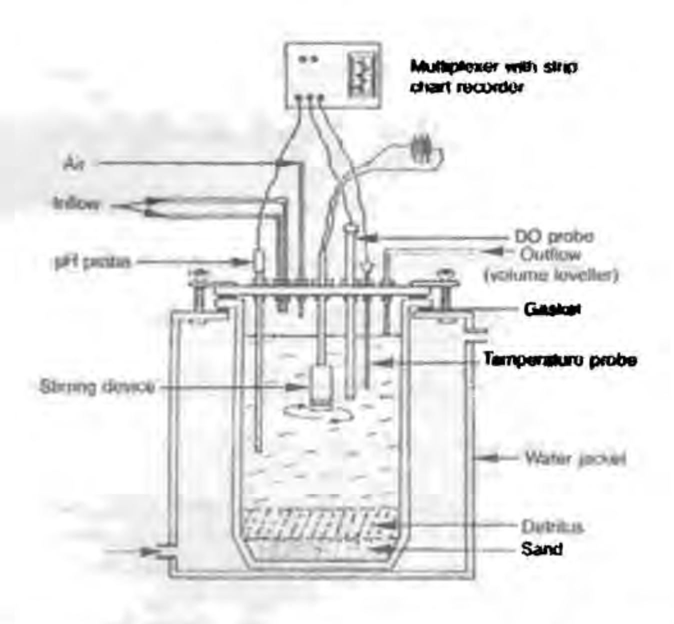
وتستطيع الأنشطة الميكروبية أن تغير من الحمضية والمحتوى الأكسجينى للماء والتربة،وتغير من توفر المواد الغذائية للنباتات والتركيبة الكيميائية للمعادن. ولما كانت تعتمد إنتاجية أى نظام بيئى على تحلل المادة العضوية والدورة الغذائية للميكروبات،فإن الإخلال بالطوائف الميكروبية،كنتيجة لإدخال كائنا عضويا جديدا،يمكن أن يغير النظام البيئى كله.

ويتوقف المصير النهائى للمادة الطبيعية والوراثية فى البيئة على بقاء واستقرار ونمو العوائل التى تأوى مجموعة العوامل الوراثية. وبالتالى يعتمد بقاء واستقرار ونمو الكائنات العضوية العائلة(الحاضنة) على مكوناتها الوراثية وعلى الخواص الفيزيائية والكيميائية للبيئة،بالإضافة إلى اعتمادها على التفاعلات مع الكائنات العضوية الأخرى الموجودة هناك.

وتشمل العوامل الفيزيائية التى تساعد فى تحديد ما إذا كان كائن عضوى جديد سيصبح مستقرا على: درجة الحرارة والضغط الجوى وأشعة الشمس

وأسطح النباتات والمواد المترسبة والعلاقات الفراغية التى تساهم فى الحماية وتراكم المادة الغذائية أو المتطلبات الكيميائية للخلايا. وتشمل العوامل الكيميائية على توفر مصادر الكربون المواد الغذائية النتروجينية وعوامل النمو والماء؛والتركيب الأيونى للتربة والماء؛ والأس الهيدروجينى البيئى؛ تكوين الغاز؛ ووجود المواد السامة.

ولما كانت الطوائف الميكروبية جزءا بالغ التعقيد من بيئتها البيولوجية والفيزيائية والكيميائية،فيتطلب تقييم المخاطر المحتملة من إطلاق كائن مجهرى جديد نظاما تجريبيا يظهر تعقد البيئة الميكروبية. وغالبا ما تستخدم لهذا الغرض العوالم الصغرى "microcosms" التى تعتبر حظائر مسيجة تعمل من داخل المعمل،تحتوى على جزء من البيئة(شكل ٨-٢).



شكل ٨-٢ مكروكوسوم(العالم الأصغر) يستخدم فى دراسة استجابة الطوائف الميكروبية المائية للاضطرابات البيئية. ويحاط الخزان المحتوى على العالم الأصغر بقميص من الماء، يعمل على تبريد أو تدفئة المحتويات. ويزود هذا الخزان بمنافذ أنابيب للحصول على الهواء والماء [illegible] لأخرى،ومزود بماسورة تدفق،تستخدم للحفاظ على مستوى مناسب من السائل. وتستخدم المجسات فى قياس الأس الهيدروجينى ودرجة الحرارة وتركيزات الهواء المذاب فى الماء داخل العالم الأصغر. ويوجد رسم بيانى مسجل،يحتفظ بتسجيل مستمر لهذه القيم،و يعطى معلومات عن استجابات الكائنات المجهرية التى تعيش فى العالم الأصغر.

ويمكن إنشاء العالم الأصغر ،إما أن يجلب إليه عينة طبيعية،أو يعاد تكوينها في المعمل. وعلى الرغم من إنشاء عالم أصغر ،فإن فائدته تتوقف على مـدى تمثيله للوضع الموجود في البيئة الحقيقية.

اكتشاف كائنات مجهرية في عينات بيئية

Detecting microorganisms in environmental samples

يتطلب تقييم مخاطر إطلاق الكائنات المجهرية إلى البيئة،أن يجرى اكتشـاف الكائن العضوى المطلوب وحصره. وليست هذه بالمهمة السهلة، لأنه يجـب أن يكشف عن الخلايا فى عينات بيئية معقدة وغير متميزة، مثل التربة والرواسـب المائية. وقد لا يمكن الكشف عن الكائنـات المجهريـة فـى البيئـة بـالطرق التقليدية،فى حين أنها لا تزال نشطة وصالحة للتطبيق. وبغض النظر عن هـذه الصعوبات المتأصلة،فقد طور رجال البيئة الميكروبية طرقا لحصر الميكروبات فى عينات بيئية تتفق مع المعايير التحليلية والفعالة،المطلوبة لأى إجراء رقابى.

وتشمل هذه المعايير، الحساسية، التى تتيح تمييز عدد قليل جدا من الكائنـات المهندسة وراثيا من كمية معقدة من الميكروبات المحلية،ويجب أن تكون الطرق قابلة للتكرار أيضا بقدر كاف،لإعطاء قياسات يمكن تكرارها فى ظل ظـروف قياسية،بغض النظر عن أى تغير فى المصدر وفى طبيعة العينـة. ويجـب أن تكون أيضا شاملة للسماح بتطبيقها على عينات من نظم بيئية متنوعة،مثل أسطح الأوراق أو مياه الخزانات الطبيعية. ويجب أن تكون محـددة بالنسـبة للكـائن المجهرى الجارى استغلاله وراثيا أو منتجاته. وأخيرا،يجب أن تكون الطـرق مجدية من ناحية التشغيل،بمعنى ذات تكلفة فعالة وقادرة علـى أدائهـا علـى مستوى من الخبرة العملية الموجودة فى معظم المعامل النوعية البيئية.

وتشتمل إحدى الطرق القديمة للكشف عن أنواع ميكروبية معينة فى عينة معقدة،استخدام وسط مزرعة انتقائى. ويتأسس هذا الأسلوب على اشتمال الوسط المستخدم لنمو البكتير على مركب،الذى إما أن يعيق نمو جميع الأنواع فيما عدا النوع الذى سيكشف عنه،أو يتفاعل بصورة معينة مع هذا الميكروب أو منتجاته ليعطى خصائص واضحة ملحوظة (شكل ٨-٣).



شكل ٨-٣ استخدام صبغة للتعرف على وجود نوع معين من الكائنات المجهرية. وتربى البكتيرياRhodo pseudomonas capsulata فى مزرعة فى وسط انتقائى يحتوى على-indolyl-٣-chloro-٤-bromo-٥β galactoside-D- كدليل لمولد الصبغ. وتبين المستعمرات الزرقاء مستنسخات الكائن العضوى التى يحتاج فيها إلى الجينات لهدم اللاكتوز. وتنتج البكتيريا المحتوية على الجينات المستنسخة إنزيمgalactosidase β الذى يزيلgalactoside من مجموعةindolyl. ويؤدى إطلاق مجموعةindolyl داخل الخلايا إلى أن تتحول إلى الأزرق.

وهناك سلسلة متنوعة متوفرة من الأوساط المزرعية الانتقائية . فإذا كان الكائن العضوى الجارى الكشف عنه مقاوما لمضاد حيوى معين ،على سبيل المثال،فسيكون من الممكن تربية هذا الميكروب فى وجود هذا المضاد الحيوى،بينما لا تستطيع الميكروبات الأخرى النمو فى وجود هذا المضاد

الحيوى. ويمكن أن يستخدم أيضا شرط توفر نوعية غذائية غير عادية لنوع ميكروبى معين.

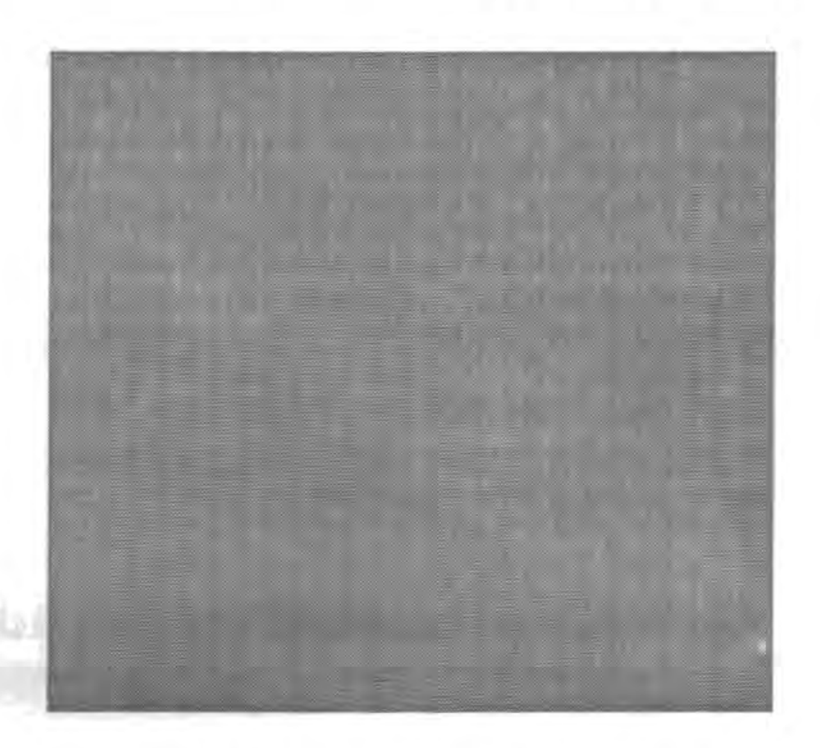
وتعتمد طرق أخرى تعتمد على المجسات التى تنتخب بشكل محدد الكائن المجهرى الجارى تحليله . وتشمل المجسات المستخدمة بكثرة، المضادات الحيوية التى تتفاعل مع بعض مكونات الخلية الميكروبية. وعادة ما تعلم الأجسام المضادة بصبغة فلورية،بحيث يمكن الكشف عنها بسهولة (شكل ٨-٤).

وأتاحت أساليب التقدم الحديثة فى تكنولوجيا الهبر ودوما،إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ لأى مكون أساسى من جدار الخلية الميكروبية،ونتيجة لذلك أعطت قدرا كبيرا من المدى والتخصصية لهذه الطريقة المنهجية. وتعتبر الأجسام المضادة الفلورية أحادية الاستنساخ دقيقة بدرجة كافية لتسمح للباحثين بالتعرف على أنواع مختلفة من البكتيريا الجذرية[٩] المثبتة للنتروجين،التى لها علاقة ارتباط وثيقة،وإلا سيصبح من الصعب تمييزها. وثبت جدوى الأجسام المضادة أيضا فى الكشف عن الكائنات المجهرية فى مراحلها الحياتية غير المزرعية.

وتعتبر الجينات المستنسخة نوع آخر من المجسات عالية الفاعلية. فيمكن أن تجعل معالجات معينة جديلتى الـ د.ن.أ المزدوجة أن تنفصلا. ولا يمكن للجديلة المفردة أن تعيد تشكيل القواعد المزدوجة التى تحمل الحلزون المزودج معا،إلا بواسطة جديلة د.ن.أ أخرى من جينات متشابهة جدا. ونتيجة لذلك،فإن جديلة جين مستنسخة والتى طعمت بصبغة أو نظير مشع أو بعض العلامات

[٩] البكتيريا الجذرية:جنس من البكتيريا يعيش على جذور القطانى القرنية مكونا العقد الآزوتية التى تزود النبات بآزوت الهواء وتغنى التربة.معجم الشهابى للمصطلحات الزراعية.المترجم

الأخرى التى يسهل الكشف عنها،يمكن أن تستخدم فى الكشـف عـن جينـات مماثلة فى الـــ د.ن.أ لكائن عضوى.



شكل ٨-٤ اكتشاف متغير معين للبكتير المسبب للكوليرا Vibrio chloerae فى عينة بيئية. تصبغ خلايـا Vibrio chloerae بجسـم مضـاد أحادى الاستنساخ، علم بصبغة فلورية. وتشع الخلايا المصبوغة باللون الأخضر، فى حين تصبغ البكتريا التى ليست لـديها المـوروث المضاد،الذى يتعرف عليه الجسم المضاد، باللورن البرتقالى.

وطورت مجسات الـ د.ن.أ أساسا كطريقة فى تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم للكشف عن مستنسخات جين محدد . ولما كانت الـــ DNA's لنوعين مختلفين متشابهان تماما،فيمكن أن تستخدم المجسات أيضا فى الكشـف عـن كائنـات عضوية معينة فى عينات بيئية، وعن الفيروسات فى النظم المائيـة ومنتجـات الأغذية.

ويمكن تبنى هذه الطريقة للكشف عـن الكائنـات العضـوية غيـر القابلـة للاستزراع،عن طريق تحليل د.ن.أ ميكروبى،تم عزله من عينات بيئية بطريقة مباشرة. ويمكن أن تستخدم فى تقدير وفرة كائن عضوى معـالج وراثيـا فـى عينة،لأنه يمكن الكشف عن الجين الغريب الذى يحتـوى عليـه هـذا الكـائن العضوى بسهولة فى الــ د.ن.أ كله بواسطة مجس مناسب.

والكشف عن كائنات مجهرية معينة بواسطة مكوناتها من الــ د.ن.أ يعتبر أمرا معقدا للغاية،حيث يمكن للبكتيريا أن تبدل مادتها الوراثيـة مـع بعضـها البعض. ومع ذلك،لا تنتقل الجينات المشفرة عن ر.ن.أ الريبوسـومات بهـذه الطريقة. فجينات ر.ن.أ الريبوسومية وتسلسلات ر.ن.أ المناظرة،تعتبر محـددة لكل كائن عضوى،ويمكن أن تستخدم بسبب تميزها الواضح. ويمكن النظر إليها على أنها مونوجرامات ذاتية لأنـواع البكتيريـة.وقـد طُبِـقَ تحليـل ر.ن.أ الريبوسومى لتحديد صلة البكتيريا، ولتشخيص الطوائف الميكروبية الطبيعية.

نقل الجين بين أنواع البكتيريا فى البيئة

Gene transfer among bacteria in the environment

قد تصبح الجينات الغريبة مستقرة فى البيئة،حتى لو فشلت فى البقاء الكائنات المجهرية المهندسة وراثيا التى حملت فى الأصل الجينات . وذلك لأن الجينات الغريبة قد تنتقل إلى الكائنات المجهرية المحلية. وقد يكون الخطر الكامن الـذى ينجم عن نقل هذه الجينات خطرا حقيقيا،لأن الجينات قد تصبح أكثر اسـتقرارا داخل الميكروبات التى توطدت بالفعل فى منطقة بيئية من الجينات الموجودة فى "المتطفلات"**interlopers** المهندسة وراثيا.

ويمكن أن تنتقل الجينات بطريقة الاقتران ،كنتيجة للاتصال المباشـر بـين الخلية الواهبة والخلية المستقبلة؛ أو بواسطة الانتقال العارض **transduction**،الذى يحدث عند اندماج فى مجموعة العوامل الوراثية**genome** لفيروس بكتيرى الذى

يصيب أنواعا بكتيرية أخرى؛أو عن طريق التحويلtransformation الذى تنتقل بواسطته الـ د.ن.أ عار إلى جدار الخلية المستقبلة، وتصبح جزءا من مادة العائل وراثية ؛أو بواسطة اندماجfusion خليتين بكتيريتين.

لم يُقيم بعد مدى حدوث وأهمية طرق النقل هذه داخل الطوائف الميكروبية فى البيئات الطبيعية. وعلى الرغم من أن المعلومات المتوفرة تفترض أن التبدلات الوراثية تحدث مرات قليلة،فإنه يجب الإجابة على العديد من التساؤلات من أجل تقييم المخاطر التى قد تكون كامنة فى إطلاق الكائنات العضوية المهندسة وراثيا،التى قد تنقل جينات غريبة إلى الأنواع الطبيعية. :هل يحدث التبادل الجينى وبأى تكرار؟ وماهى الظروف البيئية التى تؤثر على عملية النقل؟ وكيف تؤثر عمليات النقل هذه على تركيب ووظيفة طائفة الكائنات الطبيعية؟ وهل تؤثر مواقع الجينات الغريبة داخل مجموعة العوامل الوراثية للكائنات المهندسة وراثيا على نقلها؟ هل يمكن أن يكون هناك نقل من الخلايا الميتة؟ هذه الأسئلة جميعا قد بُدِءَ فى تدارسها،فى حين تساعد الطرق التى طورتها الوراثة الجزيئية فى الوقت الحالى رجل البيئة الميكروبية على القيام بالدراسات اللازمة.

ولن تقتصر التأثيرات البيئية الناجمة عن الميكروبات المهندسة وراثيا على المنطقة التى تطلق فيها،لأن لها إمكانية الانتشار. فالكائنات المطلقة يمكن أن تصل إلى مواقع جديدة عن طريق النقل بالرياح،أو بالمياه الجارية أو عن طريق الحيوانات المهاجرة. وأن أى كائن عضوى مصمم على العمل والتواجد فى بيئة معينة،قد يصبح بطريقة مجهولة حتى الآن ،لا يمكن السيطرة عليه فى موقع جديد.وعلى ذلك،فإن انتقال الكائنات العضوية المطلقة من الموضوعات المهمة فى تقييم المخاطر.

وقد عرف حتى الآن القدر الكبير عن الفيروسات الممرضة للإنسان، بسبب الرى بمياه الصرف المعالجة،وعرف أيضا الشيء الكثير عن الانتقال الشمولى

للعدوى عن طريق بعض الفيروسات الممرضة للنبات،خاصة الفطريات التـــى تنتشر عن طريق أبواغها. وقد يمكن استخدام قواعد البيانات والطرق والنماذج الرياضية لدراسة لهذه الظواهر لتتبع انتقال هذه الكائنات المهندسة وراثيا.

والاهتمامات المتعلقة بتوطن الكائنات العضوية المهندسة وراثيا واستقرارها فى المادة الوراثية وانتشارها فى البيئة،وإمكانية إفسادها للنظام البيئى،تحدد هذه جميعا موضوعات تقييم مخاطر التكنولوجيا الحيوية. وعندما تــتم الدراســات وتتوفر المعلومات المتعلقة بتقييم المخاطر ،يمكن حينئذ ترسيخ المعــايير التــى تحدد آمان منتجات التكنولوجيا الحيوية. ويعتبر هذا الإجراء النظــامى العلمــى مطلوب من أجل تحقيق الإمكانيات الصناعية والدوائية من التكنولوجيا الحيوية.

الفصل التاسع

التثبيت البيولوجى للنتروجين
Biological nitrogen fixation

الماء موجود فى كل مكان،ولا توجد منه قطرة للشرب

صمونيل كولردج(١٧٧١-١٨٣٤)

مشكلة النتروجين
The problem of nitrogen

على الرغم من أن الكلمات السابقة تشير إلى مركب الماء،إلا أنها يمكن أن تنطبق على عنصر النتروجين١، وبهذه الصورة ، فالنتروجين موجود حولنا بكل ما تعنيه الكلمة، إذ يشكل ٨٠% من الهواء الذى نستنشقه – لكنه لا يوجد لنا من سبيل للحصول عليه، وكذلك الحيوانات والنباتات والفطر وجميع البكتيريا تقريباً ، وعلى الرغم من ذلك، فالنتروجين فى صورته العضوية، يعتبر المكون الأساسى لكل الكائنات الحية، حيث تحتوى البروتينات والأحماض النووية والفيتامينات والعديد من الجزيئات "الحيوية" الأخرى على النتروجين، كيف إذن

١ـ النتروجين :جسم بسيط غازى لا لون له ولاطعم ولارائحة،يحتوى الهواء منه على ٧٩,٢% من حجمه.وهو أهم أغذية النباتات،تعطاه وهو بحالة مركبات آزوتية تكون فى الزبل والأسمدة الآزوتية وغيرها.ولايمتصه النبات من الهواء إلا نادرا فى بعض الأشنة والطحالب وفى فصيلة القرنيات بواسطة بكتيريا الأوزت.معجم المصطلحات الزراعية للشهابى. المترجم

يمكن توفير المخزون الهائل من غاز النتروجين الخامل لهذا الحشد الضخم من الجزيئات العضوية النتروجينية؟

والإجابة هى التثبيت البيولوجى للنتروجين، فلدى عدد قليل نسبياً من الأنواع البكتيرية قدرة خاصة على اختزال أو "تثبيـت" النتـروجين الجـوى لتكـوين الأمونيا،وهو المنتج الذى يمكن أن تستخدمه النباتات والميكروبـات الأخـرى كوحدات بنائية لتخليق الأحماض الأمينية، ومن ثم تخليق المركبات النتروجينية الأخرى، وعلى مستوى عالمى،تعد كميات النتروجين التى ثبتتها البكتيريا كميات هائلة، إذ تشير التقديرات إلى أن ما ينتج منه يصل إلى مائتى مليون طن سنوياً، وعلى مستوى أكثر محدودية،يمكن مشاهدة برهان واضح للأهمية الزراعيـة والإيكولوجية لتثبيت النتروجين من خلال أطول تجربة زراعية جاريـة فـى العالم.

ففى عام ١٨٤٣،حث جون بنيت لويز وهنرى جلبرت على القيام بما سمى بتجربة الـــBroadbalk فى محطة تجارب روثماستد بـانجلترا، ومنـذ بـدء التجربة بذرت مساحات من الأراضى بالقمح، وتعرضت كل مساحة لنظام أسمدة معين طوال فترة التجربة،وقدرت غلة الحبوب سنوياً، وجـاءت نتـائج ثـلاث مساحات ،عومل كل منها بنوع مختلف من الأسمدة بشيء يستحق التفكير .

عولجت إحدى هذه المساحات بصورة مستمرة بسـماد نتروجينى،بكميـات مماثلة لما يستخدم بصورة طبيعية فى زراعة غـرب أوروبـا، ولـم تعـالج المساحتان الأخريان بسماد نتروجينى ، وكانت نتيجة المساحتين غير المسمدتين أن ظهرت الأعشاب فى إحداهما ،بينما لم تتم أية محاولة لاستئصال العشب من المساحة الأخرى.

ومما لا يثير الدهشة، أن يكون محصـــول القمـــح الـــذى عـــولج بالســـماد النتروجينى محصولاً وفيراً ، بما يعادل ســـتة أطنـــان تقريبـــاً للهكتـــار فـــى العام،بالمقارنة بمحصول المساحتين غير المسمدتين ، ومن النظرة الأولى، تبدو نتائج هاتين القطعتين متناقضة ظاهرياً، فالقطعة التى نمت بها الأعشـــاب كـــان محصولها السنوى من القمح أربعة أطنان،حوالى ضعف إنتاج القطعة التى بدون عشب، ومع ذلك،فلم تكن هذه الأعشاب مجرد أية أعشاب، فقد كانت عبارة عن البيقة(نبات علفى) والبرسيم،وهما عضوا أحد العائلات النباتية،العائلة البقولية.

ويمكن أن يزدهر نمو النباتات البقولية فى ظـــل ظـــروف محـــدودة مـــن النتروجين،لأنها تصنع علاقة تكافلية فعالة مع البكتيريا المثبتة للنتروجين مـــن الجنس الجذريRhizobium(شكل ٩-١)، فالبكتيريا توفر نتروجين مثبت لتساعد نفسها والبقول على النمو، بعد ذلك،عندما تموت النباتات،تصبح التربـــة غنيـــة أيضاً بنتروجين مثبت كاف لزيادة غلة القمح فى القطعة غير المعشبة بحـــوالى ٢طن فى الهكتار أكثر من القطعة المعشبة، وتظهر التجربة بشكل واضح أنـــه يمكن يستبدل التثبيت البيولوجى للنتروجين على الأقل إلى حـــد مـــا، بالســـماد النتروجينى التجارى،خصوصاً عندما يكون ميكروب التربة المثبت للنتـــروجين مصاحباً لنبات عالى الخضرة.

وعلى الرغم من ذلك، فحتى المساحة الخالية من العشب تنتج طنـــين مـــن القمح لكل هكتار، ومصادر النتروجين لدعم هـــذا النمـــو ثلاثـــة: (١) تكـــون الأكاسيد النتروزية والملوثات الأخـــرى مـــن البـــرق والمنشـــآت الصـــناعية، (٢)الإطلاق الكيميائى البطيء للمركبات النتروجينية من التربة، (٣) التثبيـــت البيولوجى للنتروجين بواسطة بكتيريا التربة التى ليست لها علاقات تكافلية مـــع النباتات البقولية.

والهدف بعيد المدى لبرامج الأبحاث طويلـــة الأجــل للتثبيــت البيولــوجى للنتروجين، هو التقليل من الاعتماد الحالى علــى الأســمدة الكيميائيــة لنمــو المحاصيل النباتية، من خلال تحسين فاعليات ونطاقات الكائنات العضوية المثبتة للنتروجين، وينتج كل عام حوالى ٢٠ مليون طنا مــن الســماد النتروجينـــى ، وتصنع جميعها تقريباً بواسطة عمليةHaber-Bosch ،حيث يتم خلالها تمريــر نتروجين غازى وهيدروجين على حفاز عند درجة حــرارة وضـــغط عــالين لتكوين الأمونيا.

ولما كانت إحدى المواد الأولية لهذا التفاعل هى غاز الهيدروجين،فإن تخليق الأمونيا يعتبر مستهلكاً للطاقة. وعلى الرغم من أن تكاليف الطاقة لا تشكل حالياً تهديداً اقتصادياً، مثل أيام أزمة الطاقة فى فترة السبعينات،فإن التنبــوء بتــأثير تقلبات السياسة والاقتصاد على تكاليف الوقود فى المستقبل القريب والبعيد يعــد من الأمور الصعبة، بالإضافة إلى ذلك، لا يتوفر لكثير من المناطق الزراعيـــة فى العالم الأموال الكافية لشراء الأسمدة النتروجينية التجارية من أجل الحصول على إنتاجية مرتفعة من المحاصيل.



شكل ٩- ١ توضيح فوائد البكتريا الجذرية Rhizobium على نمو نباتات اللوبيا الذهبية Phaseolus beans، زرعت النباتات الثلاثة بمزيج من روث وأوراق الشجر لم يضف إليها سماد نتروجينى، والنبات الموجود على اليسار لم تضف إليه البكتريا الجذرية أو لقح النبات الأوسط بسلالة فقيرة فى تثبيت النتروجين R.phaseoli، واختير للنبات الموجود فى يمين الصورة سلالة من بكتير عالى الأداء.

ويعد التحول من الأسمدة الكيميائية التجارية إلى النتروجين المثبت بيولوجياً أمراً مرغوباً أيضاً من وجهة النظر البيئية ، حيث تتلف معظم الأسمدة الكيميائية التى تستخدم مع المحاصيل بسبب ارتشاحها من التربة، وفى أسوأ الظروف،فقد ينشأ عن ذلك تركيزات عالية من النترات غير مقبولة فى ماء الشرب، ويؤدى إلى تشبع المجارى المائية بنمو مفرط من الطحالب والكائنات الأخرى التى تنمو على النبات، ونقص شديد فى الأسماك والحيوانات البحرية المحارية.

رتــب الكائنــات العضــوية المثبتــة للنتروجيــن

The range of nitrogen-fixing organisms

يظهر فى أى قائمة من قوائم البكتيريا المثبتة للنتروجين(جدول ٩-١) عــدد مــن السـمات، أولاً،الجميــع مــن البكتيريــا:مــن النــوع البســيط بــدائى التنويprokaryotes، وبرغم الأبحاث العديــدة،فلم توجــد حتــى الآن مثبتــات نتروجين من بين الأنــواع ســليمة التنــويcukaryotes، وكمــا توضــح لنــا تجربةBroadbalk،فإن الأعشاب البقولية التى تحصل على النتــروجين المثبــت بيولوجياً بطريقة غير مباشرة،لها ميزة اختيارية قوية عن الأعشاب الأخرى فى التربة المفتقرة إلى النتروجين، وإذا كانت القدرات المثبتة للنتروجين تضفى ميزة اختيارية على أى كائن عضوى،فلماذا لم توجد خمائر مثبتــة للنتروجين،علــى سبيل المثال؟ ولماذا لــم تتطــور خلايــا النتريــت nitroplastsمثــل خلايــا الكلورchloroplastsوتتطورت الميتاكوندريا(الفتيلة الحبيبية) بشكل ظــاهرى،من بكتيريا شغلت مكان دائم فى الخلايا، وأقامت معظم علاقات التكافل الحميمــة ؟ إن الإجابة عن هذه الأسئلة غير معروفة، فقد تكون القدرة على تثبيت النتروجين قد ظهرت منذ فترة قريبة نسبياً، ولم يمض الوقت الكاف حتى تنشــأ بكتيريــا سليمة التنوى مثبتة للنتروجين.

ثانياً،يعتبر كل أعضاء نادى تثبيت النتروجين فمن الناحية التصنيفية سلاسل كبيرة ومنتشرة الوجود، فقد وجد أعضاء لها فــى مجموعــات متنوعــة مثــل البكتيريا الزرقاءCyanbacteriaالطحالب الزرقاء-الخضراء، والبكتيريا البدائيــة وفى كل من بكتيريا سلبية الجرام وبكتيريا إيجابية الجرام(وهمــا المجموعتــان

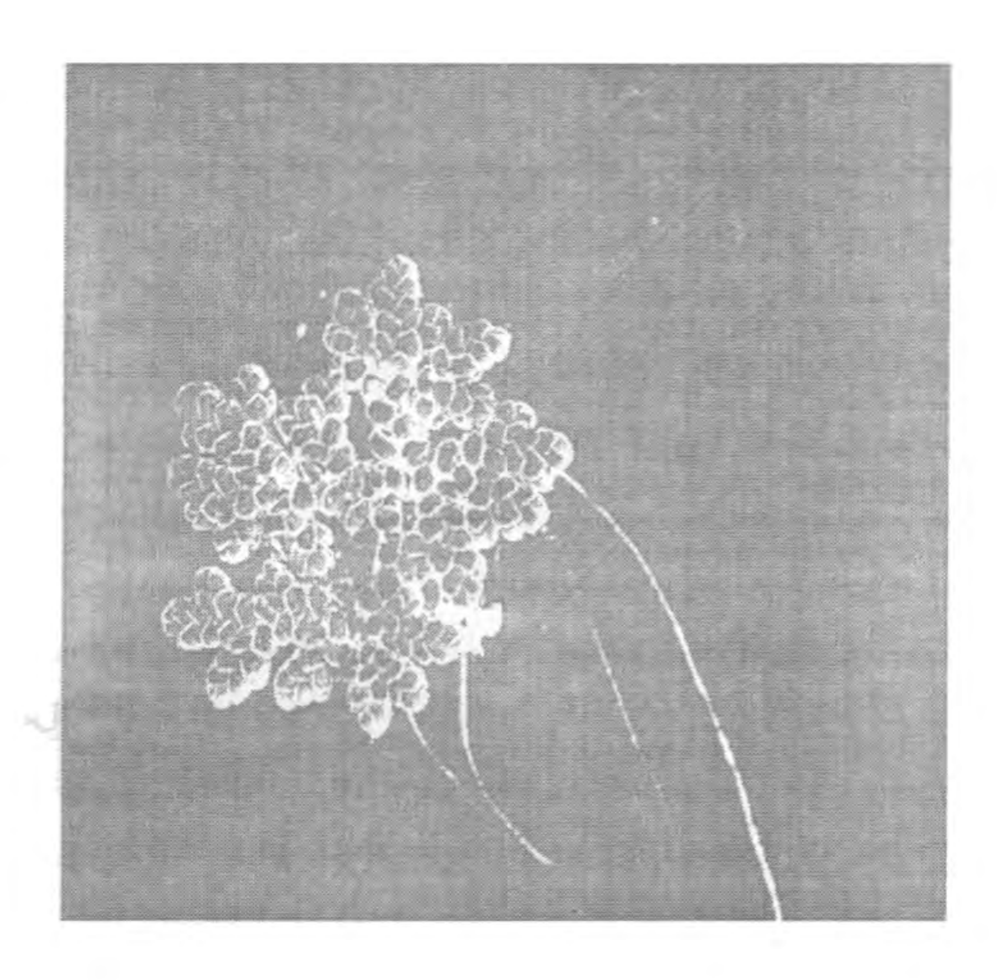
تحت الرئيستين التى تم تمييزهما على أساس قدرتهما على قبول صبغة جـــرام التى استنبطها الفيزيائى الدنمركى كريستيان جرام)، ومع ذلك، لا توجد داخـــل كل من هذه المجموعات إلا سلالة أو نوع يثبت النتروجين أحياناً، وقــد يكـــون سبب التوزيع التصنيفى،هو النشوء الجانبى،والذى انتقلت من خلاله جينات تثبيت النتروجين،جيناتnif حسب ما يطلق عليها، من نوع لآخر.

جدول٩-١ بكتيريا مختارة مثبتة للنتروجين

النوع	المجموعة البكتيرية	تعليقات
Klebsiella pneumoniae	Gram- negative	نظام نمونجى لوراثيات جينات nif
Azotobacter vinelandii	Gram- negative	تثبت النتروجين من الجو، وتحتوى على بروتين يحمى إنزيم نتروجيناز من ضرر الأكسجين.
Rhizobium species	Gram- negative	تثبت النتروجين فى عقد جذور النبات البقلى.
Rhodospirillum, Rhodopseudomonas	Gram- negative	بكتيريا التخليق الضوئى الإرجوانية-الخضراء
Frankia	Gram-positive actinomycete	تثبت النتروجين فى عقد جــذور الكثيــر مــن الأشجار والشجيرات المعشبة
Closrridium	Gram-positive	لاهوائية إجبارياً
Anabaena	Filamentous Blue-green alga	تثبت النتروجين فى خلايا متخصصـــة تســمى هيتروسايتس،وترتبط بعض الأنواع نباتات راقية مثل السيكاسيات والأزولا.
Methanococcus	Archaebacterium	
Azospirillum	Gram- negative	تصاحب جذور الحشائش

ثالثاً: لا تثبت العديد من البكتيريا النتروجين بنفسها،لكنها تتفاعل بصورة تكافلية مع النباتات الراقية، ويرجع السبب فى هذا إلى مسألة الطاقة، فالرابطة الثلاثية التى تربط ذرتى النتروجين الموجودتين فى جزيء النتروجين الغازى،هى رابطة يصعب كسرها، وكما أن هناك تكلفة مرتفعة لإنتاج الأمونيا بطريقة كيميائية ،فهناك عبء طاقة مرتفع يقع على كاهل البكتيريا المثبتة للنتروجين، وعندما تصاحب البكتيريا النباتات الخضراء المثبتة للكربون، تكون النتيجة تبادلاً غذائياً رائعاً بين البكتيريا والنبات،حيث يحصل النبات على نتروجينه المثبت وتحصل البكتيريا على الكربون المثبت الذى تحتاجه للحصول على الطاقة.

وتتنوع هذه العلاقات التكافلية تنوعاً كبيراً، فبالإضافة إلى التفاعل بين البقوليات وأنواع عديدة من البكتيريا الجذريةRhizobium genus، توجد على سبيل المثال، مشاركة بين الطلحب الأزرق-المخضر المثبت للنتروجين وأزولا سرخس الماءwater fern Azolla(شكل ٩-٢)الذى استخدم منذ قرون عديدة كمصدر للسماد النتروجينى فى حقول الأرز، ومع ذلك، لا تقتصر العلاقات التكافلية على النبات والبكتيريا فحسب ، فالنمل الأبيضTermites ،الذى يلتهم الأخشاب،يحتوى فى معدته على طوائف من البكتيريا المثبتة للنتروجين، تساعد الحشرات على التغلب على نقص النتروجين فى غذائها الرئيس.



شكل ٩-٢ ورقة سرخسية من سرخسة مزهرة من جنس Azolla caroliniana. تحتوى كل ورقة من السرخس على تجويف صغير يحمل الطحلب الأزرق-الأخضر Anebaena azollae المثبت للنتروجين، وتستخدم السرخسة المزهرة فى تسميد حقول الأرز فى جنوب شرق آسيا.

الكيمياء الحيوية لإنزيم النتروجيناز

Biochemistry of nitrogenase

تعتمد القدرة الخاصة لبكتيريا تثبيت النتروجين على اختزال عنصر النتروجين إلى أمونيا على احتوائها على نظام إنزيمي يسمى "مركب النتروجيناز"، ويبدو أن المركب متشابه تماماً فى كل مثبتات النتروجين التى تمت دراستها حتى الآن،ويمكن تطبيق المعلومات المأخوذة من إحدى هذه المثبتات على جميع المثبتات الأخرى.

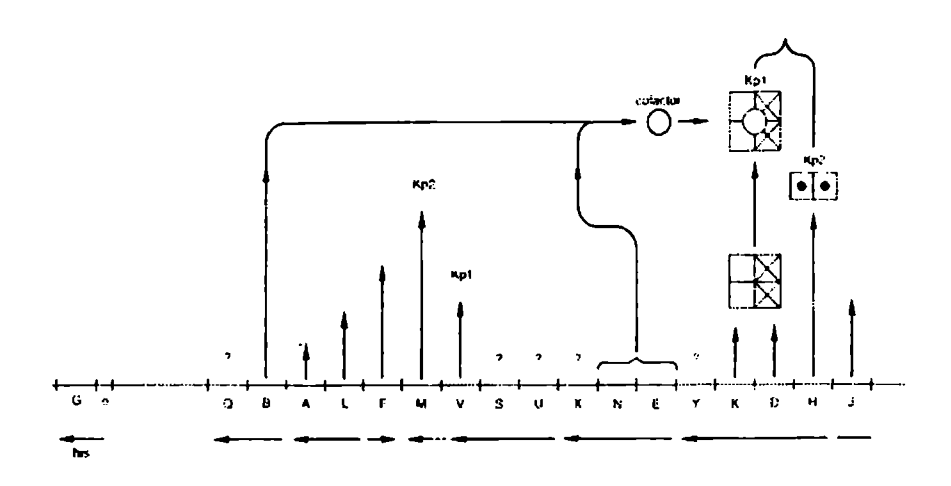
وتفيد المعارف الحالية بأن مركب النتروجيناز يتكون من ستة بروتينات ويحتوى على نشاطين إنزيميين مختلفين،أحدهما يسمى نتروجيناز، والآخر يسمى نتروجيناز ردكتاز (شكل ٩-٣)، ويحتوى جزء النتروجيناز فى المركب على أربعة وحدات فرعية، أى نسختان لكل من البروتينين المختلفين، ويحتوى تركيبه أيضاً على عامل مساعد cofactor، وهو العامل المساعد حديد-موليبدينيوم الذى يحتوى على معدن الحديد والموليبدنيوم، وبرغم سنوات الدراسة الطويلة لتركيب العامل المساعد ،إلا أنه لا يزال مجهولاً.

والتفاصيل الدقيقة لكيفية عمل النتروجيناز ليست واضحة تماماً، فعنصر النتروجين يرتبط ولاشك بالعامل المساعد والذى بعده يختزل إلى أمونيا عن طريق إضافة أيونات الهيدروجين والإلكترونات ، ويتم الحصول على أيونات الهيدروجين من الماء خلال عدة خطوات،ولا تزال طبيعتها الدقيقة مسألة جدلية.

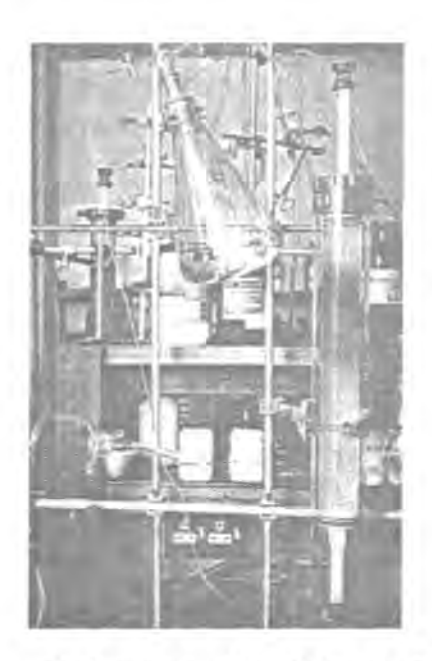
ويعد اختزال النتروجين عملاً مكلفاً للطاقة؛حيث يحتاج اختزال جزيء واحد من النتروجين إلى أمونيا حوالى ٢٠ إلى ٣٠ جزيء من ثلاثى فوسفات

الأدينوزين(ATP)،وهو العامل المسؤول عن طاقة الخلية، وعلاوة على ذلــك، ينطوى تفاعل النتروجيناز على بعض الإسراف، حيث يختزل أيضـــاً أيونـــات الهيدروجين إلى جزيء هيدروجين،وينطلق فى صورة غاز.

ويحتوى نتروجيناز ردكتاز ذا الــوزن الجزيئـــى ٦٠٠٠٠،علـــى وحـــدتين فرعيتين من البروتين المتماثل،الذى له صفة اللون البنى، لاحتوائه على عناقيد من الحديد والكبريت (شكل ٩-٤)، وكما يوحى اسم الإنـــزيم ،فإنـــه يختـــزل النتروجيناز، ومن ثم يسد نقص الإلكترونات المستخدمة فى اختزال النتروجين، ويكتسب الردكتاز الإلكترونات التى نقلها من بروتينيات أخرى،والتـــى تتغيـــر هويتها الحقيقية فى مختلف البكتيريا المثبتة للنتروجين.



شكل ٩- ٣ مجموعة جينات nif لبكتيريا كليبسلا الرئوية، رتبت جينات nif السبعة عشر فى ثمان وحدات نسخية، وتوضح الأسهم أبعاد وتوجيه هذه الوحدات النسخية، وعندما تعرف أدوار جينات nif الفردية بشكل محدد، فإنها تظهر على المخطط، حيث يحـــدد جين nifH متعدد ببتيد لإنزيم نتروجيناز ردكتاز(Kp٢)،ويحدد الجينان nifD و nifK متعدد ببتيد النتروجيناز(Kp١)، ويحتمل أن يستخدم جين nifQ فى امتصاص الموليبدنيوم،وقد يستخدم الجينان nifS و nifU فى تصنيع النتروجيناز، و يســـهم الجينـــان nifA و nifL فـــى تنظيم الجينات الأخرى فى المركب، ويعتبر Fe-Mo cofator، عامل مساعد الحديد-الموليبدنيوم.



شكل ٩-٤ تنقية النتروجيناز . ينقى النتروجيناز الذى يتم الحصول عليه من بكتيريا كليبسيلا الرئوية بواسطة عمود الفصل الكروماتوجرافى (أى عن طريق الإمتزاز فى طبقات مختلفة التلون)، و تظهر بروتينات النتروجيناز (المنطقة الداكنة) باللون البنى لاحتوائها على الحديد.

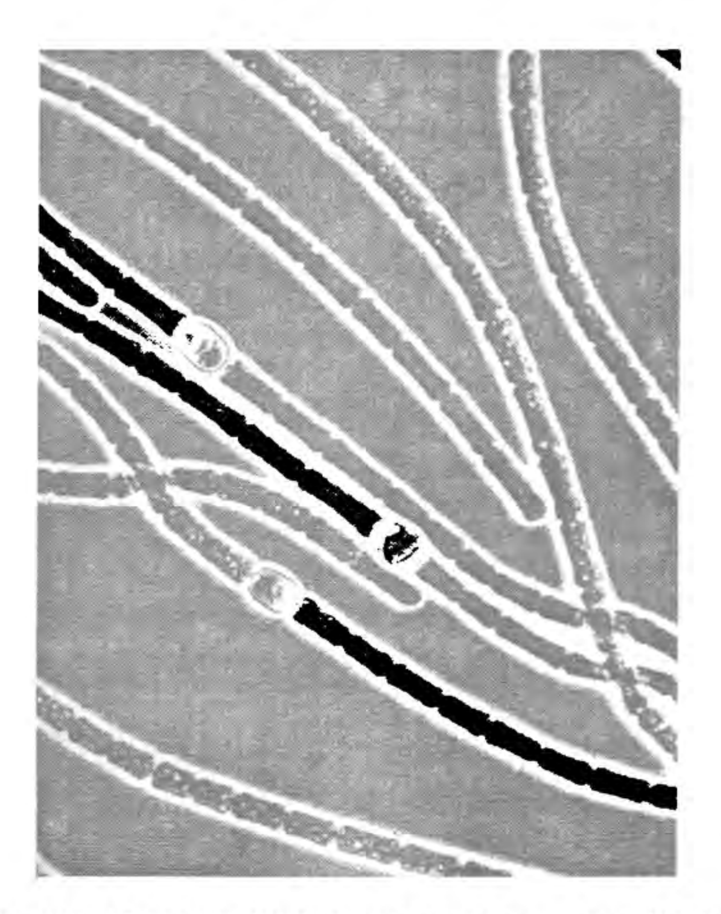
مشكلة الأكسجين

The oxygen problem

وهناك نقطة أخرى فى غاية الأهمية بالنسبة للنتروجيناز،وهى تسممه بفعل الأكسجين، فعندما يتعرض الإنزيم للجو، يفقد بشكل نهائى نصف نشاطه فى غضون ثلاثين ثانية،وهى مشكلة يبدو أنها مشتركة بين جميع النتروجينازات المثبتة للنتروجين، وقد وجدت الكائنات العضوية المختلفة طرق متنوعة،البعض منها عادى،ولكن البعض الآخر بارع جداً لحل مشكلة الأكسجين.وإحدى الحيل البارعة التى تتبعها بكتيريا من جنس المجزآت المغزلية Clostridium genus، هى أن تعيش فى بيئة خالية من الأكسجين؛وبالنسبة لهذه البكتيريا ،لن يحدث

الخطر الناجم من ضرر الأكسجين ، وهناك مثبتات نتروجينية أخرى، مثل بكتيريا كليبسلا رئوية Klebsiella pneumoniae يمكن أن تعيش إما مع الأكسجين أو بدونه،لكنها لا تثبت النتروجين إلا عندما تنمو بطريقة لا هوائية.

والطحالب الخضراء-الزرقاء،التى يمكنها القيام بكل من التمثيل الضوئى وتثبيت النتروجين،يبدو أنها تلعب بالنار،لأن الأكسجين ينطلق بصورة نشطة أثناء التمثيل الضوئى، ومع ذلك، فلديها طريقتين على الأقل للتعامل مع هذا الخطر المحتمل . فهناك فاصل زمنى فى بعض الطحالب الزرقاء-الخضراء لتثبيت النتروجين،الذى يحدث عادة أثناء الليل،ويحدث التمثيل الضوئى أثناء النهار،وقد طورت الطحالب الزرقاء- الخضراء ذات الخيوط العديدة،مثل Anabaena حلا أكثر تعقيداً، فخلايا الخيطيات تقوم بالتمثيل الضوئى بصفة عامة،ولكن فى الظروف التى يفضل فيها تثبيت النتروجين،يتميز البعض منها لينتج خلايا غير ممثلة للضوء متميزة من ناحية الشكل،تقوم بتثبيت النتروجين(شكل ٩-٥).



شكل ٩-٥ خيوط طحلب من جنس blue-green alga Anabaena ، تقوم الخلايا المستطيلة بعملية التمثيل الضوئى بينما لا تقوم بتثبيت النتروجين ، حيث يسمم الأكسجين المنطلق أثناء عملية التمثيل الضوئى الإنزيمات المثبتة للنتروجين ، والخلايا البيضاوية الكبيرة . متغايرات المثانة "heterocysts" هى التى تقوم بتثبيت النتروجين، و تعمل الجدران السميكة لمتغايرات المثانة على منع الأكسجين من الدخول، وتخمد نشاط الإنزيمات المثبتة للنتروجين.

وراثة تثبيت النتروجين

Genetics of nitrogen fixation

يجرى دراسة عدد متزايد من بكتيريا تثبيت النتروجين بأساليب الوراثة والبيولوجيا الجزيئية، لكن الكائن العضوى التجريبى الأصلى فى هذه الدراسات والذى حظى بالفحص والدراسة إلى حد بعيد، هو بكتيريا كليبسلا الرئوية

Klebsiella pneumoniae ، وهذا البكتير من النوع غير التكافلى، وينمو بصورة أفضل فى المزرعة، وعلاوة على ذلك، فإنه يتعرض لنفس التحايل الوراثى التى تعرضت لها بكتيريا أ.كولاى التى تنتسب إليه.

وما تم معرفته عن جينات nif لبكتيريا كليبسلا الرئوية Klebsiella pneumoniae، لم يقدم إطاراً فكرياً فحسب لدراسة الوراثة الكيمياء حيوية لتثبيت النتروجين، لكنه قدم أيضاً أدوات سهلت بدرجة كبيرة تحليل عملية تثبيت النتروجين فى البكتيريا الأخرى،التى تعتبر أقل خضوعاً للتحليل الوراثى، وقد أجريت معظم الأبحاث على تمييز وعزل جيناتnif لبكتيريا Klebsiella pneumoniae فى وحدة تثبيت النتروجين بجامعة Sussex بانجلترا، التى يترأسها جون بوستاج، وفى معامل ونستون بريل فى جامعةWisconsin(ماديسون)، وفرديرك أوسبل بجامعة هارفارد فى كمبردج، بماساشوستس.

وهناك منطقة صغيرة نسبياً من كرموسوم بكتيريا كليبسلا الرئوية،عندما تنقل إلى بكتيريا أ.كولاى، تسمح للخلايا المستقبلة بأن تثبت النتروجين،وهى نتيجة توضح أن جينات nif لبكتيريا كليبسلا الرئوية تتجمع على د.ن.أ كروموسومى، وعلى الرغم من أن اختزال النتروجين إلى أمونيا،يبدو أنه تفاعل مباشر،حيث تخصص بكتيريا كليبسلا الرئوية للتفاعل ما لا يقل عن ١٧ جيناً، تشغل حوالى ٢٢كيلو قواعد من الـد.ن.أ فى عنقود جين nif (شكل ٩-٣).

ويحدد جين nifH بروتين نتروجيناز ردكتاز،ويشفر الجينانnifD وnifK عن عنصرى البروتين للنتروجيناز، وهناك خمس جينات(nifB,Q,V,N and E) مستخدمة بطريقة ما غير محددة حتى الآن ، فى تخليق العامل المساعد حديد-

موليبدنيوم،وتحدد الجينان(nifF و nifJ) متعدد الببتيد المطلوب لنقل الإلكترون إلى النتروجيناز ردكتاز، وهناك ثلاث جينات(nifM,nifS و nifV) يتطلبهـا النضـج الوظيفى الكامل لمركب نتروجيناز،ويبدو أن الجينينnifA و nifL ينظمان تعبير كل جيناتnif الأخرى ، وأخيراً، لا تزال وظائف الجينان nifX و nifY مجهولة حتى الآن.

وظهر أن العديد من جيناتnif لكائنات عضوية أخرى مثبتة للنتروجين،تشبه فى تركيبها تماماً تركيب بكتيريا كليبسلا الرئوية ، على الرغم من أن الجينـات فى مثبتات النتروجين الأخرى،توجد عادة مبعثرة حـول مجموعـة العوامـل الوراثيةgenome بدلاً من تجمعها بصورة متماسكة كما هو الحال فى بكتيريـا كليبسلا الرئوية.

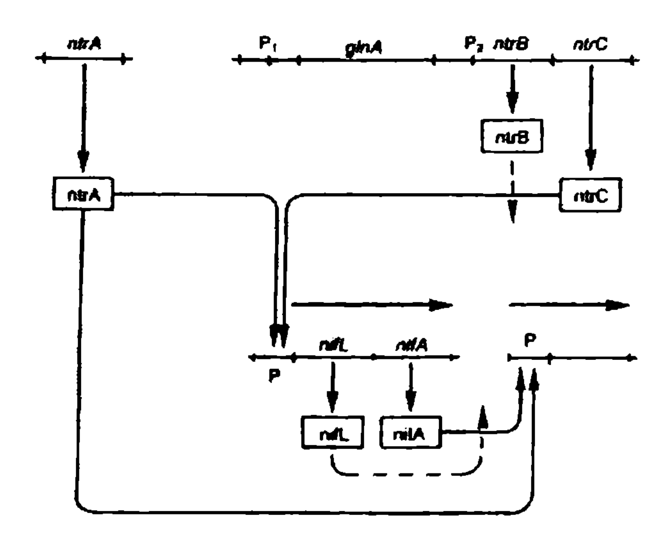
تنظيم تعبير جين نيف

Regulation of nif expression

إذا كان لدى البكتيريا المثبتة للنتروجين،مصدر مناسـب مـن النتـروجين المثبت،مثل الأمونيا أو الجلتاميت أو الأ سباراجين، لكـان قـد توقـف نسـخ جيناتnif ،بحيث لا تبدد الكائنات العضوية طاقتها المطلوبة لتخليق البروتينات، ولا تبدد ثلاثى فوسفات الادينوسين المطلوب للقيام بتفاعل الاختـزال، وعنـدما تتعرض الجينات للجو، لا يعبر عنها أيضاً ، ويؤدى هذا أيضا إلى فهم بيولوجى جيد،

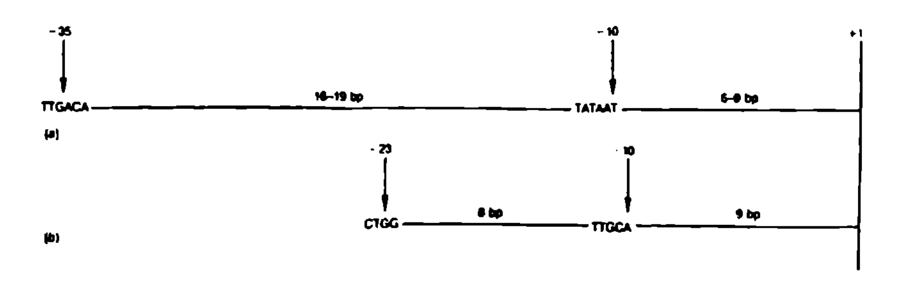
ما الهدف من تخليق النتروجيناز،إذا كانت تأثيرات الأكسجين السامة ستخنقه منذ لحظة انطلاقه؟

ومرة أخرى، قدمت دراسات بكتيريا كليبسلا الرئوية نموذجاً لتحليل تنظـيم جين nif فى مثبتات النتروجين الأخرى (شكل٩-٦). و تظهـر الدراسـات أن تنظيم جينnif معقداً تماماً،إذ يتضمن على كل من التحكم المحلى للجينات داخل مركب nif ،وعلى السيطرة الأكثر شمولاً للجينات المنظمة الموجودة فـى كـل مكان فى مجموعة العوامل الوراثية، ويتطلب بدء تعبير جينات الـــnif مثل كل الجينات الأخرى، إنزيم بوليمراز الــ ر.ن.أ لنســخ الـــ د.ن.أ فــى ر.ن.أ الرسول.



شكل ٩-٦ تنظيم تعبير جينnif فى بكتيرياكليبسلا الرئوية ، والعلاقة بين نسخ جينnif ، وجينات ntrA وntrB وntrC . وكمـا أوضحنا بالنص، يعمل جين nifA يعمل على تنشيط محرضات جيناتnif الأخرى، ولكن فى وجود الأكسجين والأمونيا، يمنع جين nifL هذا التنشيط(الخط المتقطع)، ويحتاج جينnifA أيضاً ،الذى يقوم بدور الوسـيط فـى عمليـة التنشـيط إلـى منـتج جـينntrA، وبالمثل،ينشط الجينntrC مع للجينntrA المثير nifL وA،ولكن فى وجود نسبة عالية من الأمونيا ،فإن الجينntrB يوقف هـذا النشاط ، ويمكن للجينينntrB و ntrC أن ينسخا أى محرض من المحرضين، ويشترك أحدهما(P1) أيضا فى نسخ جينglnA، وهـو الجين الإنشائى لإنزيم جلتامين سينسيتاز.

والمثيرات Promoters هى مناطق التحكم عند بداية الجينات التى يجب أن يرتبط بها بوليمراز الـ ر.ن.أ أثناء بدء النسخ، وتعتبر التسلسلات النكليوتيدية لمحرضات جينnif مختلفة جداً عن جينات بعض البكتيريا التى درست بشكل جيد، وهى بكتيريا أ.كولاى(شكل ٩-٧). ويوحى هذا بأن بوليمراز الـ ر.ن.أ الذى يتعرف على جينات nif للمحرضات،يختلف عن الإنزيم الذى يرتبط بمحرضات الجينات الأخرى، وفى واقع الأمر،فقد تم تأكيد هذا الافتراض مؤخراً.



شكل ٩-٧ الاتجاه العكسى لتسلسلات المحرض من جيناتnif و من جينات أ.كولاى، وتظهر بداية النسخ بالعلامة ١+(bp و هو اختصار لكلمة التزاوج القاعدى)، ولمحرضات أ.كولاى(a) تسلسلات محفوظة عند -٣٥ و- ١٠ بالنسبة لبداية النسخ، بينما تختلف محرضاتnif (b) فى كل من هويتها وفى تباعد تسلسلاتها المحفوظة.

وتبطل تماماً الطفرات الموجودة بجين يسمى ntrA(حيث تشير ntrA إلى تنظيم النتروجين)،الذى لا يعتبر عضواً من مركب جينnif تثبيت النتروجين، وقد أثبت بوريس ماجاسانيك من معهد ماساشوستس للتكنولوجيا فى كمبردج بولاية ماساشوستش و أس.كستو من جامعة كاليفورنيا فى دافيذ،أن الجينntrA يشفر عن بروتين يسمى معامل سيجما،يكسب بوليمراز الـ ر.ن.أ القدرة على التعرف على محرض جينnif ، وبدون هذا البروتين،فلا يمكن نسخ جينات nif وأيضاً الجينات المنظمةnifA وnifL ،ولن يحدث تثبيت للنتروجين. وتساعد

عوامل سيجما أخرى بوليمراز الـــ ر.ن.أ على التعرف على مثيـــرات الجـــين الأخرى.

بيد أن مجرد الحصول على بوليمراز الـــ ر.ن.أ الصحيح،لا يعد كافياً لأن يحدث نسخ جينnif ، وهناك جين من داخل المركب، وهو جينnifA يصـــنع بروتينا، يعتبر ضرورياً أيضاً لإحداث نسخ جينnif ، وتعبير الجينnifA بنفسه ينشط ويخمد تبعًا للظروف البيئية .

وجينntrA وثلاث جينات إضافية-glnA وntrB وntrC- تعتبـــر جـــزء مـــن النظام الشامل الذى ينظم الأوجه العديدة لعملية أيض النتروجين فى البكتيريـــا، وفى غياب مصادر النتروجين، مثل الأمونيا والجلتاميت،فإن المنتجntrC ينتقـــل إلى الجينات التى تجعل البكتيريا تستخدم المركبات الأخـــرى المحتويـــة علـــى النتروجين،والتى تكون عادة من المصادر غير المفضلة لهذا العنصر، ومن بين الجينات التى ينتقل إليها المنتجntrC، جينnifA،الذى ينشط حينئذ مركب جينnif، ويعيق منتجntrB تنشيط هذا الوسيطntrC لجينات nif عندما تكـــون تركيـــزات الأمونيا عالية، وأخيراً،يسهم جينnifL فى إعاقة تعبير جينات nif فـــى وجـــود مصدر نتروجينى، مثل الأمونيا أو فى وجود الأكســـجين، وعنـــدما يتعـــرض منتجnifL للأمونيا أو الأكسجين،فيبدو أنه يمنع بروتينnifA من إحـــداث نســـخ جيناتnif أخرى.

التثبيت التكافلى للنتروجين

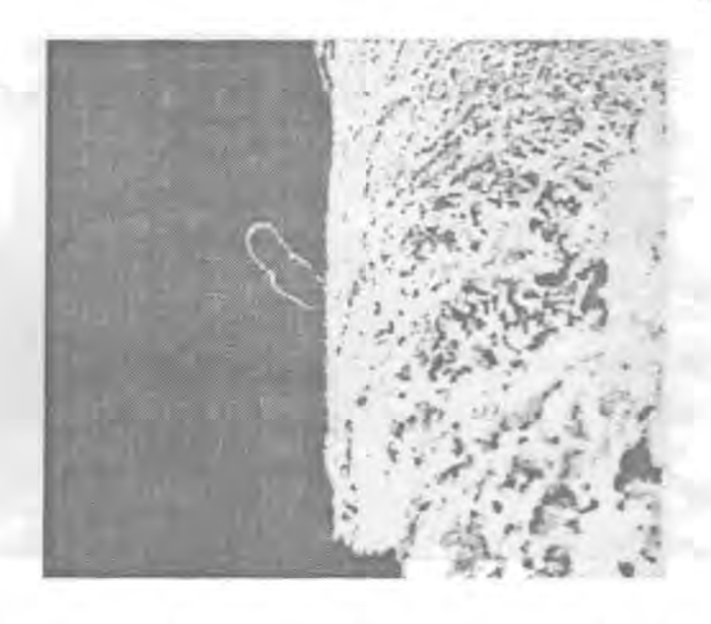
Symbolic nitrogen fixation

البكتيريا الأكثر أهمية فى تثبيت النتروجين من الناحية الزراعية والبيئية، هى تلك البكتيريا التى تصنع مع النباتات علاقة تكافلية، التى إما أن تكــون علاقــة تكافلية بسيطة أو مركبــة، ففــى أحــد التفــاعلات البســيطة،يعيش البكتيــر Azospirillum حول أسطح جذور الحشائش، على رغم وجود علامات استفهام فيما إذا كانت النباتات تتلقى أية مساهمة محسوسة من النتــروجين مــن هــذا الاتحاد.

ولا تنشأ تلك التساؤلات فى حالة التفاعلات الأكثر تعقيداً بين بكتيريــا مــن النوع الجذرى Rhizobium والبقوليات، أو بين بكتير Frankia وعدد مختلف من الأشجار والشجيرات بما فيها شجر جار الماءalder، وتســتطيع البقوليــات أن تعيش فى تربة فقيرة بالنتروجين، نتيجة لعلاقاتها التكافلية فى تثبيت النتروجين، وأهمية هذه العائلة فى الزراعة أهمية كبيرة، فالعديد من المحاصــيل البذريــة العالمية بقوليات، تضم فول الصويا والبازلاء والفول والفول السودانى والعــدس والحمص، ويجب أن تضاف إلى هذه البقوليات البقوليات الورقية مثل البرســيم والبرسيم الحجازى،التى تتغذى عليها الحيوانات، ولا يستخدم أى من عوائــل بكتيرياFrankia فى الزراعة،لكنها غالباً ما توجد كأنواع رائدة، تســاعد علــى استصلاح الأراضى البور.

ويتطلب فهم هذه العلاقات التكافلية،تحليل ليس فقط لجيناتnif ،ولكن أيضــاً للنبات الخاص والجينات البكتيرية التى تجعلها تشترك فى هذه العلاقات المعقدة،

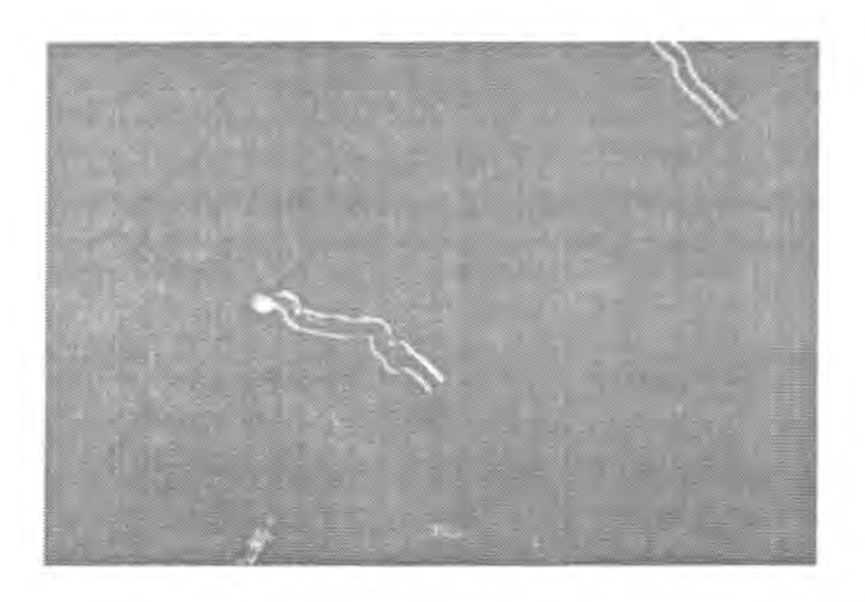
ومن النظرة الأولى، يبدو أن أفراد البكتيريا من النـــوع الجـــذرى hizobium، بكتيريا عادية قضيبية الشكل(شكل ٩-٨)، ولا تســتطيع معظــم الســلالات أن تتحايل لتثبيت النتروجين،عندما تنمو بمفردها فى المزرعة، ومع ذلك،فلدى هذه البكتيريا القدرة الفريدة على التعرف وغزو بقوليات معينة،وتحدث فى النبــات العائل استجابة متناسقة ،تتضمن على انقسام خلية منتظم وتخليق سلســلة مــن البروتينات.



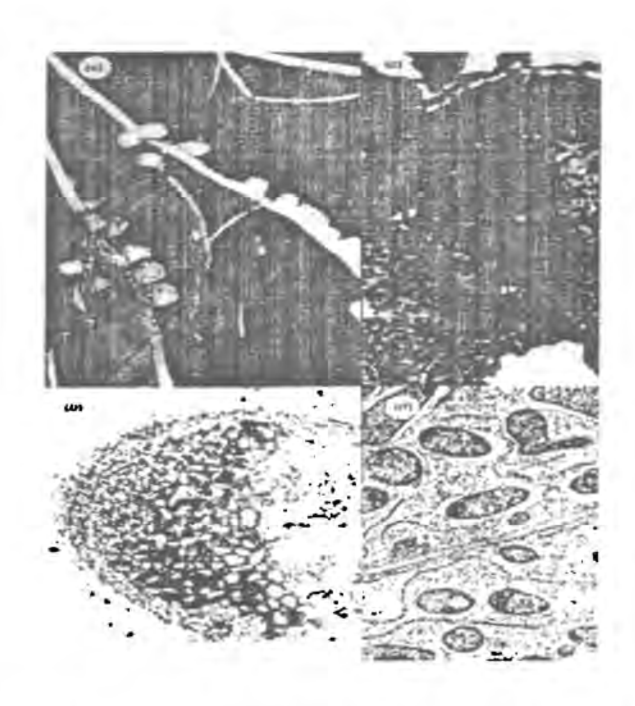
٩-٨ بكتيريا جذرية على شعيرة جذرية ، وتوضح صورة المسح الإلكترونى بكتيريا قضيبية الشكل ملتصقة بشعيرة جذريـــة لنبـــات البازلاء.

وعادة ما يكون موقع الإصابة عند طرف شعرية جذرية نامية،التى إمـــا أن تلتف أو تتفرع أو تتلولب، تبعاً للبكتيريا الغازية(شكل ٩-٩)، وتدخل البكتيريـــا من خلال خيط الإصابة،وهو الأنبوب الذى يصنعه النبات، والذى ينمو بجـــوار الشعيرة الجذرية ويتضاعف هناك، ووجود خيط الإصابة،الذى يحتمل أن يرتبط

بإشارات من الـــبكتيريا الجذرية على ســـطح الجذر،يحـــدث انقســـاماً للخلايـــا الموجودة فى الجذر،ونتيجة لذلك يكون عقدة أوليةincipient nodule، ومع تطور العقدة، يستمر خيط الإصابة الأولى فى النمو والتفرع، ويتقدم خلال وبين الخلايا الجذرية للنبات العائل. وتنكمش البكتيريا داخل خيط الإصابة وتحاط بغشاء نباتى معين،وبعد ذلك تنتشر فى سيتوبلازم الخلايا العقدية(شكل ٩-١٠).



شكل ٩-٩ شعر جذرى ملتف لنبات بازلاء ، يتشوه الشعر الجذرى بعد إصابته بالبكتيريا الجذرية ، ويمكن رؤية خـــيط الإصـــابة الذى ينقل البكتيريا داخل النبات فى مركز الشعيرة.



شكل ٩-١٠ منظومة عقد نبات البازلاء،التى أوجدتها وشغلتها البكتيريا Rhizobium leguminosarum. (a) المظهر الميكروسكوبى للعقد على جذور البازلاء. (b) صورة مصغرة توضح قطاع طولى فى عقدة بازلاء. (c) خلايا البازلاء المقحمة مع البكترينيات المثبتة للنتروجين، (d) بكترينيات محاطة بغشاء حول بكتيرى.

وتعرف خلايا البكتيريا الجذرية Rhizobium المنطلقة من العقدة المثبّتة للنتروجين بالبكترينيات bacteroids، وبهذه الصورة تنشط عادة البكتيريا جيناتها الـ nif ، وتفرز الأمونيا الناتجة فى النبات العائل، والذى يقوم بتمثيل هضم الأموناً بتكثيفها بحمض جلتاميك لتكوين الجلتامين، و من ثم يستخدم الجلتامين فى توزيع النتروجين المثبت إلى بقية أجزاء النبات.

وغالباً ما تظهر العلاقة التكافلية بين البقل، والبكتيريا الجذرية تخصص لسلسلة عوائل،وهناك أنواع بقولية معينة لا تكون عقدا إلا مع أنواع معينة من البكتيريا(جدول ٩-٢)، وبالنسبة لبعض البكتيريا التى تشمل على

R.leguminosarum و R.trifolii و R.phaseoli، التى تكون عقدًا فــى البــازلاء والبرسيم واللوبيا الذهبية على التوالى،يبدو أن سلسلة العائل البكتيرية هى السمة الوحيدة التى تميز الأنواع المختلفة.

وهناك أنواع بكتيريا جذرية أخرى بها الكثير من الاختلافــات الكمياحيويــة الأساسية،بالإضافة إلى تنوع تخصص سلسلة العائل، ويتعلق المثال الأكثر لفتــاً للنظر فى التمييز ما بين الأنواع سريعة النمو والأنواع البطيئة النمــو، وعلــى أساس الخصائص البيوكميائية وتماثلات الــــــ د.ن.أ،فلهــذين المجمــوعتين تشابهات قليلة جداً بخلاف قدرتهما على تكوين العقد فى البقوليات، ولهذا السبب، صنفت الأنواع البطيئة النمو فى الآونة الأخيرة علــى أنهــا أعضــاء جــنس جديد،Bradyhizobium والذى يعنى حرفياً بكتيريا جذرية بطيئة، وبغض النظر عن هذه الاختلافات،فإن أى عقدة مثبتة للنتروجين،يمكن أن تتشابه تماماً،بغض النظر عما إذا كانت ناتجة عن الأنواع سريعة النمو أو الأنواع البطيئة النمو.

جدول ٩-٢ أنواع بكتيريا جذرية منتخبة وعوائلها النباتية

النوع البكتيرى	النبات العائل	تعليق
Rhizobium	Peas,Vicia (Broad bean)	أنواع مرتبطة ارتباطاً شديداً ببعضها البعض
Leguminosarum	lentils	
R.trifolii	Clover	
R.phaseoli	Phaseolus bean	
R.loti	Lotus	يكون اللوتس عقد أيضاً بواسطة براوبرازبيوم
R.lupinii	Lupin	
R.meliloti	Alfalfa	
R.sesbania	Sesbania	يحدث عقد بالجذر والساق على سسبانيا ويثبت النتروجين أيضاً فى المثبت الذى ينمو بصورة طليقة
R.fraedii	Soybean	يحدث عقد غير ثابتة فى معظم مثبتتات فول الصويا
Bradyhizobium Japonicum	Soybean	تثبت بعض السلالات النتروجين الذى ينمو بصورة طليقة
B."cowpea miscellany	يكون عقد فى العديد من التبوليات الموارية التى تضم كاوبى وأيضا البارامبوتيوم غير البقولى	له القدرة على تكوين عقد فى عائل غير بقولى

ومما لا يثير الدهشة،فإن التخليق الشكلى الذى يحدث أثناء تطور العقدة،ينعكس على المستوى البيوكميائى، وأحد الأمثلة الواضحة فى البكتيريا الجذرية هو نشاط جينات nif، ولكن عند مقارنة كل بروتينات البكتيريا التى تعيش معيشة حرة ببروتينات البكترينيات، يكشف عن وجود مجموعة بروتينية

مختلفة تماماً فى كلتا الحالتين، فالعديد من الجينات التى يخمد نشاطها فى الخلايا البكتيرية الحرة،تكون نشطة فى البكتيرينيات والعكس صحيح.

ويظهر التكوين البيوكميائى للبروتينات الذى تصنعه عقدة النبات أيضاً تغيرات كبيرة بالمقارنة بالتكوين الكيميائى للبروتينات فى الجذور الغير مصابة، فهناك ما لا يقل عن ٥٠بروتيناً جديداً تسمى nodulins قد تم الكشف عنها بشكل مفصل فى العقدة،وقد يكون مجموع البروتينات المحددة للعقدة أضعاف هذا الرقم، ولا يعرف إلا وظائف القليل من هذهnodulins، والبعض،مثل إنزيمات الجلتامين سينساز واليوركاز، إنزيمات يتطلبها التمثيل الهضمى للأمونيا، ويقوم الـ nodulin الأكثر وفرة،الهيموجلوبين البقولى، بنقل الأكسجين إلى البكترينيات المثبتة للنتروجين.

ويضفى(الهيموجلوبين البقولى) صفة اللون الوردى على العقد المثبتة للنتروجين(شكل ٩-١١و٩-١٢). ويوجد هذا البروتين على وجه الحصر فى سيتوبلازم الخلية النباتية،لكنه إلى حد ما يعتبر العالم الأصغر microcosm لعملية التكافل، وتحدد مجموعة العوامل الوراثية للعائل، الجزء البروتينى من جزىء الهيموجلوبين البقولى، بينما تصنع البكتيرينية جزء الـ haem، وعلى الرغم من أنه يعتقد بصورة شائعة أن الهيموجلوبين البقولى يحمى النتروجيناز من التلف،إلا أن وظيفته الأساسية هى توصيل الأكسجين إلى البكتيرينيات،التى تحتاج إلى مزيد من الأكسجين للحصول على الطاقة أثناء تثبيت النتروجين،ذلك لأن بيئتها المجاورة تفتقر جداً إليه.

وتتشابه جينات الهيموجلوبين البقولى لفول الصويا بدرجة ملحوظة مع جينات هيموجلوبين الثدييات، وعلاوة على ذلك، تحتوى العقد الجذرية المتكونة على

للنباتات غير البقولية بواسطة بكتيرياFrankia أيضاً على الهيموجلوبين البقولى، وتثير هذه المكتشفات تساؤلات عن التاريخ الارتقائى للجزيء، هل كان موجوداً فى الأصل فى جميع النباتات، لكنه فقد بعد ذلك من معظمها؟ وهل ينشأ بشـــكل مستقل فى مجموعات نباتية مختلفة؟ وإذا كان الأمر كذلك، هل كان هذا النشوء بالطرق التقليدية، أو هل يمثل الهيموجلوبين البقولى إحدى إبـــداعات الطبيعـــة المبدلة ؟ بمعنى ،هل انتقل جين الهيموجلوبين البقولى بطريقة ما مـــن حيـــوان ثديى بدائى إلى نبات؟ لا تزال هذه الأسئلة تبحث عـــن إجابات،كتلـــك الأســـئلة الخاصة باستجابة البقوليات للإصابة بالبكتيريا الجذرية .

التحليل الوراثى للبكتيريا الجذرية

Genetic analysis of Rhizobium bacteria

البكتيريا الجذرية من أنواع البكتيريا الأكثر بساطة وقبولاً للتحليل الـــوراثى عن عوائلها من النباتات البقولية، فليس من المدهش والحال كـــذلك، أن يكـــون التقدم فى تمييز الجينات البكتيرية المطلوبة لتثبيت النتروجين التكافلى وتكـــوين العقد سريع جداً عن التقدم الحادث فى تمييز جينات النبات التى تساهم فى هـــذه الأنشطة،وعلاوة على ذلك ، فقد ساعد إلى حد كبير،عزل جيناتnif فى بكتيريا كليبسلا الرئوية على تمييز الجينات المماثلة فى البكتيريا الجذرية ، والتسلسلات النكليوتيدية لجينات nif من بكتيريا مختلفة متشابهة تماماً لدرجـــة أن جينـــات بكتيريا كليبسلا الرئوية يمكن أن تستخدم كمجسات للبحث عن جينـــاتnif فـــى الأنواع الأخرى.

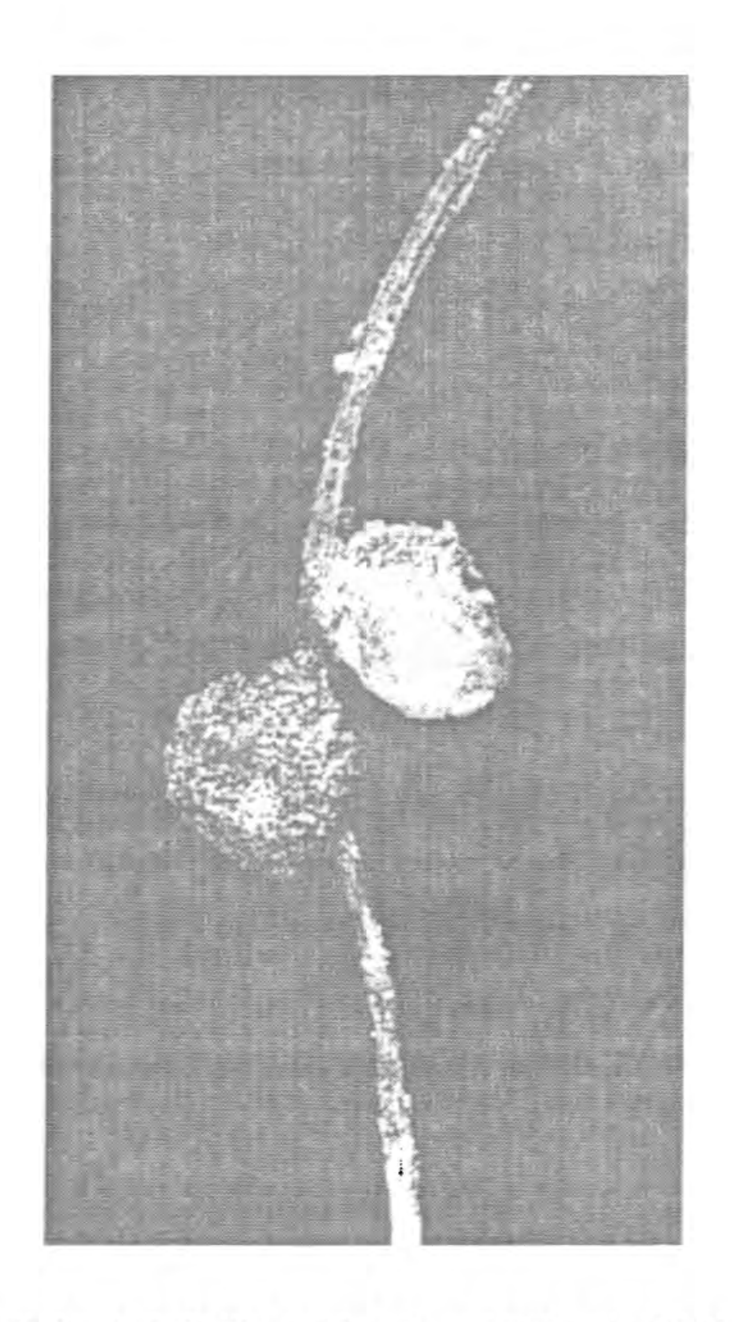
وباستخدام هذا الأسلوب،أوضح الباحثون بما فيهم فرانك كانون وزملاؤه فى مجموعة ساسكس، أن جيناتnif للبكتيريا الجذرية سـريعة النمو،تقـع فـى بلازميدات كبيرة تسمى بلازميدات تكافليـة(شـكل ٩-١٣)، وتحتـوى نفـس البلازميدات أيضاً على جيناتnod ، التى تحتاجها البكتيريا للحث على تكـوين العقد بواسطة النبات العائل، وتقع جينات nif و nod على كروموسوم بكتيرى فى بكتيريا Bradyrhizobium .

والسؤال البالغ الأهمية حالياً فيما يخص جينات nif فى البكتيريا الجذرية هو لماذا لا تعبر هذه الجينات إلا فى العقد ولا تعبر فى البكتيريا فى حالة معيشـتها الحرة بعيدة عن العائل النباتى، وتعتبر مجموعة العوامل المنظمة التى تؤثر على تعبير جينات nif فى الأنواع الريزوبومية مشابهة تماماً لمجموعـة العوامـل المنظمة فى بكتيريا كليبسلا الرئوية، وقد أوضح الباحثون فـى معمـل أسـبل. وباحثون آخرون فى أندرو جونستون فى معهد جون انيس فى نوريش بانجلترا. وفى هانك هينيك فيEidgenossische Technische Hochschule فـى زيـورخ بسويسرا، أن الأنـواع R.leguminosarum و R.meliloti و R.japonicum لهـا جينات متشابهة فى التسلسل للجـين التنظيمـيnifA لبكتيريـاK.pneumoniae. بالإضافة إلى ذلك، فإن محرضاتnif فى بكتيرياRhizobium وKlebsiella لهـا تسلسلات متشابهة، وفى حقيقة الأمر،فإن النسخ من محرضاتnif فى البكتيريـا الجذرية يمكن أن ينشطه منتج جينnifA لبكتيريـا كليبسـلا الرئويـة.وهـذه التشابهات، على الرغم من أنها تقلل تماماً تركيز الأكسجين والأمونيا فى وسط نمو بكتيريا كليبسلا الرئوية،فإنها تنشط على الفور تثبيت النتروجين فـى هـذا الكائن العضوى،لكنها ليس بذات تأثير على تثبيت النتروجين فى معظم البكتيريا

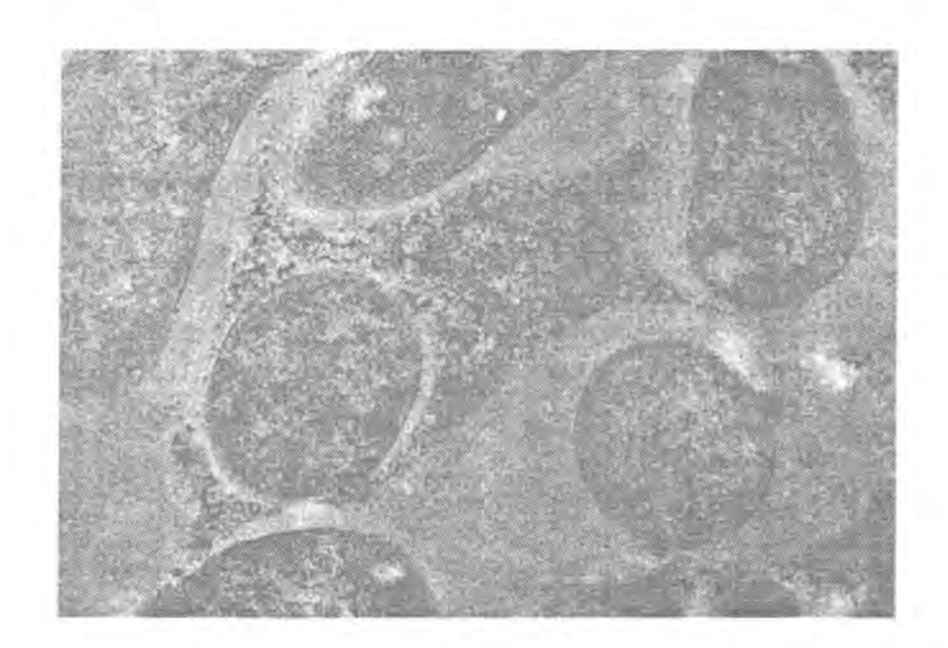
الجذرية ، ولا تزال تمثل المكونات الخاصة في العقد الجذرية التى تتحايل على البكتيريا الجذرية لكى تنسخ جينات الـــــnif، أحد الأشياء المجهولة فى أبحاث تثبيت النتروجين.

وعلى الرغم من أن التعرف على العديد من جينات nif فى البكتيريا الجذرية ،قد أصبح يسيراً جداً من خلال استخدام المعلومات المتاحة من بكتيريا كليبســـلا الرئوية ، فلم تجد البكتيريا غير التكافلية المثبتة للنتروجين أية مساعدة،عند القيام بتحليل الجينات المطلوبة لتكوين العقد، فلابد وأن يبــدأ العمــل مــع البكتيريــا الجذرية من الصفر.

وسطح البكتيريا الجذرية ،الذى يجب أن يلامس فى إحدى النقاط جذر النبات العائل، من المتوقع أن يكون محددا مهماً فى تكون العقد والتخصص. وقد ظهر هذا إلى حد ما من خلال الدلالة الوراثية،فبعض الطفرات التى فشلت فى صــنع بوليمار خارج الخلية،يسمى بــــ exopolysaccharide ،لا تســتطيع أيضــاً أن تكون عقد لنباتاتها العائلة الطبيعية (شكل ٩-١٤) ، ومع ذلك،فالمســألة ليســت بهذه البساطة ، فالسلالات الطافرة الأخرى التـــى ينقصـــها عديـــد الســكريات الخارجى exopolysaccharide ، تستطيع تكوين العقد ولكنها لا تستطيع أن تثبت النتروجين، ويبدو أن أنواع أخرى لا تزال غير تالفة، سواء فى تكوين العقد أو فى تثبيت النتروجين، وقد تعكس هذه التغييرات حتى الآن، المهارات المجهولة فى التفاعل بين exopolysaccharide والنبات العائل.



شكل ٩-١١ العقد المثبتة و غير المثبتة للنتروجين على جذر نبات بازلاء، فقد لقح نبات البازلاء بسلالتين من بكتيريا R.leguminosarum. واستطاعت إحداهما أن تثبت النتروجين، وأخرجت عقداً وردية اللون تحتوى على الهيموجلوبين البقولى. ولم تستطع السلالة الأخرى أن تثبت النتروجين،ونتيجة لذلك تظهر العقدة شاحبة جدا لاحتوائها على كميات صغيرة جداً من الهيموجلوبين البقولى .



شكل ٩-١٢ تمركز الهيموجلوبين البقولى فى سيتوبلازم الخلية النباتية . وقطعت عقدة بازلاء مثبتة للنتروجين إلى قطاعات رفيعة جدا، التى كانت تسبح فى جسم مضاد محدد للهيموجلوبين البقولى ، وبعد ذلك وسم الجسم المضاد بجسيمات من الذهب، التى تظهر كنقط داكنة، ووجدت النقط قاصرة على سيتوبلازم النبات،وغير موجودة فى البكتيرينيات، أو الفراغ المحيط بها.



شكل ٩-١٣ تصور لبلازميد تكافلى من نوع **R.leguminosarum.** . تم استخراج بلازميد د.ن.أ من خلايا أحد الأنواع البكتيرية البرية(الصورة اليسرى) ومن طافر غير مكون للعقد(الصورة اليمنى)، وقد أظهر فصل بلازميدات مختلفة بواسطة الهجرة الكهربية على جل من الأجاروز.أن لنوع البكتير البرى ثلاث بلازميدات، بينما فقد الطافر البلازميد الأصغر،البلازميد التكافلى.



شكل ٩-١٤ مظهر طافر من بكتيرياR.leguminosarum،التى لا يوجد بها عديد السكريات الخارجيةexoplysaccharide بصورة سليمة، ويوضح الطبق العلوى سلالة النوع البرى،ويحتوى الطبق السفلى على طافر لم يعد يصنع عديد سكريات خارجية،ولا يكون عقد على جذور البازلاء.

وكما ذكرنا من قبل، فإن نفس البلازميدات الكبيرة التى تحمــل جينــاتnif لأنواع البكتيريا الريزوبومية سريعة النمو، تحتوى أيضاً علــى عناقيــد مــن جيناتnod ، تسهم فى تكوين العقد، وقد أوضح العديد من الباحثين أن نقل الـــ د.ن.أ المحتوى على جينات nod من بكتيرياR.leguminosarum التى تكون العقد فى البازلاء،إلى بكتيريا جذرية أخرى، تكون العقد بصورة طبيعية فى البرســيم أو الفول، يكسب البكتيريا المستقبلة القدرة على تكوين العقد فى البازلاء.

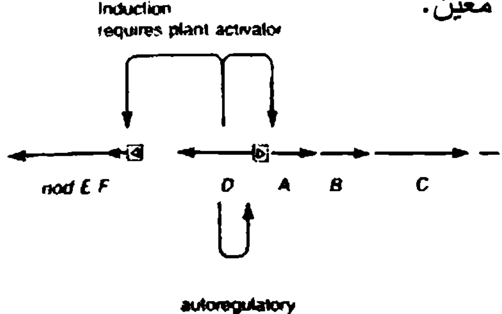
إلا أن ذلك لا يعنى أن عنقود بلازميدnod ،هو كل مــا تحتاجــه البكتيريــ الجذرية لتكوين العقد، فالبكتيريا من جنس البكتيــر الزراعــى وثيقــة الصــلة بالبكتيريا الجذرية ،بالرغم من أن أنواع البكتيريا الزراعية ليست لهــا قــدرات على تكوين العقد، أو تثبيــت النتــروجين، وبإدخــال جينــات nod لبكتيريــ

R.leguminosarum فى خلايا البكتيريا الزراعية لا يعطى البكتيريا القدرة على تكوين العقد الطبيعية فى جذور البازلاء،بالرغم من أنها تحدث "عقد كاذبة" تكون خاليـــة مـــن البكتيرينيـــات، وتظهـــر النتيجـــة أنـــه يجـــب أن تحتـــوى بكتيرياR.leguminosarum على جينـــات إضـــافية مـــن أجـــل ظهـــور العقـــد الطبيعية،لكنها غير موجودة فى أنواع البكتيريا الزراعية .

وقد كشف تحليل عنقود جين nod الجذرى عن بعـض الحقـائق المتعلقـة بوظائف الجينات وتنظيمها ، واشتملت مجموعات البحث التى شاركت فى هـذا العمل مجموعة من جونستون، وآدم كوندروسى من مركز الأبحاث البيولوجية الأكاديمية المجرية للعلوم فيSzeged ، و شارون لونج من جامعة ستانفورد فى بالو ألتو بكاليفورنيا، وبارى رولف من الجامعة الوطنية الأسترالية فى كنبره.

وقد تم التعرف على ثمانى جينات فى العنقود ،وسميت بأسـماءnodA إلـى nodF وnodI و nodJ (شكل ٩-١٥ ، وجدول٩ــ٣). وتبطل الطفرات الموجودة فى الجيناتnodD وA وB وC تكوين العقد،فى حين تؤخر الطفرات الموجـودة فى الجينات الأربع الأخرى فقط بدء نمو العقدة،وتقلل الأعداد المتكونة، وعلى الرغم من الاختلافات الموجودة فى تخصصات سلسلة العائل للأنواع الجذريـة العديدة،فإن جيناتها الـnod المناظرة،تتشابه فى التسلسل والموقـع والوظيفـة، ويعد هذا التشابه ميزة، لأن استنتاج دور جينnod معين فى أحد الأنواع،قد يمكن استقراؤه لإعطاء معلومات عن وظيفته فى الأنواع الأخرى.وتنسخ جيناتnodA وnodb وnodC وnodI وnodJ كوحدة واحـدة،ويظهر أنهـا تحـدد بروتينـات مصاحبة للغشاء البكتيرى، فجين nodI يشفر عن بروتين قد يكون مرتبطا بنقل الغشاء،على الرغم من عدم معرفة هوية المادة التى قد يحملها عبـر الغشـاء ،

تنسخ جيناتnodE و nodF أيضاً مع بعضهما، ويعتبر جينnodE مشابه للبروتين الحامل لـــلأسيل،ذلك البروتين الذى يسهم فى تخليق الأحماض الدهنية، وسواء كان جينnodF مرتبطاً أيضاً بعملية تخليق الدهن،فلا يزال هذا الأمر مجهـــولا، وقد يساعد جينnodE على منع تكون العقد فى البقوليات، فضلاً عـــن العائـــل الطبيعى لنوع جذرى معين.



شكل ٩-١٥ تمثيل جيناتnod لبكتيرياR.leguminosarum، و الطريقة التى تنتظم بها، وقد وضحت أبعاد واتجاهات نسخ جينات nod الثمانية، وتظهر المناطق المنظمة فى صورة مثلثات داخل مربعات، وينظم جينnodD نسخه فى وسط مصفر،فى حين يتطلب تنشـــيط جيناتnod الأخرى عوامل(الفلافونيات والفلافلتونيات) من البازلاء،بالإضافة إلى منتج جينnodD.

جدول ٩ـ٣ خصائص جينات تكوين العقد فى البكتيريا الجذرية

الجين	طول المنتج الجينى (كيلو دالتون)	تأثير الطفرة a	تعليق على دور المنتج الجينى
NodA	١٨	Nod-Rhc-	مرتبط بالغشاء
NodB	٢٣	Nod-Rhc-	--
NodC	٤٦	Nod-Rhc-	مرتبط بالغشاء
NodI	٣٤	Nod delay	نقل البروتين؟
NodJ	٢٧	Nod delay	مرتبط بالغشاء؟
NodD	٣٤	Nod-Rhc-	تنظيم
Nod F	١٠	Nod delay	يشابه حامل البروتين أسيل
NodE	٤٨	Nod delay	--

aNod- فشلت فى تكوين عقد؛ Rhc- فشلت فى فتل الشعريات الجذرية.

تنظيـــم تعبيـــر جيـــن نـــود

Regulation of nod gene expression

وتبين أن آخر جينات الـــــــnod هـــذه،جين nodD، أنـــه مـــن الجينـــات المنظمة،حيث يتحكم فى نسخ كلاً من نفسه وجينات nod الأخرى الموجودة فى المجموعة ، وعندما تحفظ البكتيريا الجذرية فى وسط استزراع مصـــغر،يعبر الجينnodD بمستويات عالية،بينما لا تنسخ جيناتnod الباقية، ومع ذلك ، فقـــد وجد اختلاف مثير،عندما تعرضت الخلايا البكتيرية إلى نتح جذور البازلاء أو البرسيم أو البرسيم الحجازى، فقد ازداد حينئذ نسخ جميع جيناتnod ، ماعـــدا جين nodD بحوالى ٧٠ ضعفاً.

يعتمد هذا التأثير على وجود جينnodD نشط،تلك النتيجة التـــى توضـــح أن لجينnodD دوراً منظماً. فإحدى المواد الموجودة فى الجذر،تفرز وتـــؤثر مـــن خلال الجينnodD،لإحداث نسخ نشط لجينات nod الأخرى، فمن الاتجاه العكسى لبداية كل من جيناتnodA و B و C و I و J وجيناتnodF وE،تكـــون الوحـــدات المنظمة ناقصة،قطعة د.ن.أ المحتفظة التى قد تكون مرتبطة فى عملية تنظيمها، ويتعرض جين nodD نفسه، على الأقل فى بكتيريا R.leguminosarum للتنظيم السلبى من خلال منتجه، والذى ترفض تركيزاته العالية نسخ الجين.

وبتحليل إفراز جذور نباتات البازلاء والبرسيم الحجازى ،تم التعرف علـــى العديد من مركبات الوزن الجزيئى المنخفض، التى تستطيع تنشيط نسخ

جينات nod، والجزيئات هى مركبات من نوع الفلافين[٢] flavone أوالفلافانون flavanone (شكل ٩-١٦). ووجد أن للمركبات المتوفرة تجارياً من هذه الفئات القدرة على الحث على تنشيط جينات nod.

5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanone
(hesperetin)

5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavanone
(eriodictyol)

شكل ٩-١٦ التركيب الكيميائى لاثنين من الفلافانونيات، التى تنشط نسخ جين nod

وعلى الرغم من معرفة الكثير عن موقع وتركيب الجينات التى تسهم فى عملية تكوين العقد وتثبيت النتروجين،إلا أنه لا يزال هناك الكثير المطلوب القيام به لترجمة المعلومات المجمعة على مستوى د.ن.أ إلى فهم حقيقى للكيمياء الحيوية وبيولوجيا الإصابة بالبكتيريا الجذرية ، فالتحليل الجزيئى للعلاقة التكافلية بين البكتيريا الجذرية والبقل،قد يكون لها أبعاد كثيرة،تختلف تماماً عن أهمية التفاعل ذاته .

[٢] ـ الفلافين:مركب بللورى لا لون له،ولايذوب فى الماء،ويعتبر المادة الأصلية لمجموعة أصباغ صفراء. (المترجم)

ويمكن النظر إلى البكتريا الجذرية والكائنات العضوية الأخرى،التى تشترك فى عمليات معقدة مع النباتات،سواء أكانت هذه العمليــات تكافليــة أو محدثــة للأمراض،على أنها تثير استجابات كيميائية حيوية وشكلية معينة للنبات العائل، وإذا أمكن تأسيس الآلية الدقيقة التى تحدث بها البكتيريا الجذرية التفافاً لشعيرات الجذور،وتكون إصابة الخيوط ، وانقسام الخلايا الجذرية،فقد تؤدى المعلومــات إلى فهم أفضل لكيفية تحديد نمو وتخليق الخلايا النباتية والأعضاء بصفة عامة.

سمــاد نتروجينى بسعر خيالى: كيف يمكن تحقيق هذا الحلم؟

Cost-free nitrogen fertilizer:how real a prospect?

تشمل دراسة التثبيت البيولوجى للنتروجين سلسلة من الــنظم العلميــة،التى تتراوح ما بين الكيمياء غير العضوية إلــى علــم الإنزيمــات، والفســيولوجية الميكروبية، والوراثة الجزيئية، والتفاعلات ما بين الميكــروب والنبــات، إلــى علمى الزراعة والبيئة، أين يمكننا أن نبحث فى هــذه المتعــددة الجهــود عــن التطورات التى ستقدم فى المستقبل مصادر النتروجين المثبت لتغذية النبات،الذى سيكون أكثر قبولاً على المستوى الاقتصادى والاجتماعى والبيئى عن الاعتمــاد الحالى المنقل على الأسمدة التجارية؟ أى من هذه التكهنات التى يمكن اعتبارها "شطحات من الخيال"،وأيها التى تحمل آمالاً حقيقية يمكن أن تتحقق ؟

تلقى الكيمياء والكيمياء الحيوية لتثبيت النتروجين حاليًا اهتمامًــا أقــل ممــا يفترض أن تستحقه مقارنة بمجالات البيولوجيا والوراثة الجزيئيــة المتعــارف عليها، وبالنسبة للنتروجيناز،حبت الطبيعة العالم بإنزيم يختزل النتروجين عنــد ضغط جوى وعند درجة حرارة محيطية، ويجب أن يكون توضــيح تركيبــات

الحفاز المسمى بالعامل المساعد حديد-موليبدينيوم لإنزيم النتروجينـــاز، وكـــذا الوسائط بين ركيزة النتروجين ومنتج الأمونيا النهائى على قمة أولويات البحث.

ويمكن أن تكون الوراثة أداة قوية جداً فى هذا البحث ، فالطفرات التى تعرقل تخليق العامل المساعد حديد-موليبدنيوم عند مراحل مختلفة متــوفرة، ويمكـــن استخدامها فى توضيح كيف يصنع العامل المساعد، وللمساعدة علـــى وصـــف تركيبه، وقد تؤدى هذه الدراسات إلى حفازات لإنتاج الأمونيا،لا تحتاج درجات حرارة وضغطا عاليين لاختزال النتروجين ،وربما الأكثر أهمية ،التى تعطـــى الهيدروجين لتفاعل الاختزال،ليس من غاز الهيدروجين المكلف للطاقة،ولكن من الماء،الذى يعتبر المصدر الهيدروجينى المحتمل للتفاعل الإنزيمى.

وهناك عيبان آخران للنتروجيناز ،هما حساسيته المفرطة للأكســجين وميلـــه المسرف لإطلاق غاز الهيدروجين أثناء اختزال النتروجين، وبمعلوميـــة هـــذه الخصائص كلية الوجود فى جميع الدراسات النتروجينية حتى الآن،فـــإن هـــذه الخواص قد تكون مصاحبة بشكل مطلق لنشاط الإنزيم، ولكن أهى كذلك؟ فنسبة عدد الإلكترونات الموجهة نحو تكوين الهيـــدروجين إلـــى عـــدد الإلكترونـــات المستخدمة فى اختزال النتروجين،ليست دائماً نسبة ثابتة، حيث تتأثر هذه بالوفرة النسبية لركائز التفاعلين ووضع الخلية من الطاقة.

كانت المحاولات لعزل أشكال طافرة من النتروجيناز تكون أقـــل حساســـية للأكسجين محاولات دون المستوى المطلوب ، بالإضافة إلى ذلك،لم يكن هنـــاك الجهد الجاد الموجه نحو الحصول على طفرات مـــن جـــينnif ، التـــى تحـــدد بروتينات النتروجيناز التى تطلق هيدروجيناً أقل من سلالات النـــوع البـــرى، وعلى الرغم من وجود نظم "امتصاص الهيدروجين" فى بعض ســـلالات مـــن البكتيريا الجذرية يمكنها إعادة دوران الهيدروجين بصـــورة نشطة،واســـتخدام الطاقة التى تحل محله لتثبيت النتروجين،إلا أن التلقيح بهذه السلالات لم يضف

حتى الآن سوى تأثيرات غامضة على نمو النبات، وسواء كان يمكن أن يتحسن نتروجيناز بالنسبة إلى الهيدروجين ومشاكل الأكسجين أم لا ،لا يمكن التنبـوء به- غير أن هذه الطريقة لم تلق الاهتمام الكافى حتى الآن.

وتتضمن استراتيجية أخرى لتحسين التثبيت البيولوجى للنتروجين ،معالجة واستغلال الميكروبات غير التكافلية المثبتة للنتروجين ،مثل طحالـبAnabaena الزرقاء-الخضراء، حيث تحتفظ كل من هذه الكائنات العضوية بالأمونيا التـى تثبتها بصورة مستميتة،وتمثلها هضماً إلى أحماض أمينية وبروتينات بمجرد أن تصنعها، ومع ذلك،فقد تم عزل طفرات من الـAnabaena التى تحرر بعـض أو كل النتروجين المثبت ، فإذا أمكن استخدام هذه الطفرات فيما بعد فى إنتـاج سلالات جديدة ذات معدلات تثبيت نتروجين متزايدة،فقد يمكـن إضـافة هـذه الطحالب الزرقاء-الخضراء فى مياه الرى وتعطى نتائج مفيدة ، وتكـون هـذه الاستراتيجية أكثر ملاءمة فى مناطق العالم التى يتوفر بها ضـوء كـاف مـن الشمس،وستكون جذابة على وجه الخصوص فى المناطق التـى تعتمـد علـى مستويات الزراعة،يكون فيها أى إضافة من الأمونيا،أفضل مما هو سائد حالياً، أى لا شيء على الإطلاق.

وهناك مجموعة ثانية من البكتيريا غير التكافلية المثبتة للنتروجين ،والتى قد تكون أكثر قابلية للاستغلال،وهى البكتيريا التى تعـيش علـى أسـطح جـذور النباتات. ففى منتصف السبعينات،كان هناك اهتمام مكثف بأحد هذه الكائنـات، بكتيرياAzospirillum ،بناء على النتائج التى كانت تفترض أن تثبيت النتروجين بواسطة هذه البكتيريا على جذور الحشائش والذرة والحبـوب الأخـرى تفيـد النباتات العائلة، وقد ترددت ادعاءات بأن الذرة يمكن أن تحصل على الكثير من النتروجين المثبت بيولوجياً مثل فول الصويا، وأدت الأبحاث التالية فى الصوبة الزجاجية والحقل إلى نقصان سريع لهذه التفاؤلية،وقد وصلت الأبحاث الجاريـة

الآن مع بكتيرياAzospirillum إلى مستوى متدنى، إلا أنه من الممكن فى ظل خيبة الأمل الحالية مع الكائن العضوى،أن يصرف النظر تماماً عن هذ الموضوع.

فهذا البكتير،قبل كل شيء يثبت النتروجين ويصاحب جذور بعض المحاصيل النباتية الرئيسة فى العالم، يجب أن يكون من الممكن الحصول على طفرات الـAzospirillum التى تثبت نتروجين أكثر من سلالات الأنواع البرية، تكون أقل عرضة لرفض تعبير جينات nif فى وجود النتروجين المثبت،وتكون أكثر قدرة على إطلاق بعض النتروجين التى تثبته بدلا من تمثيله هضماً فى الحال.

ولا يوجد ضامن بأن هذه الطفرات ستضفى أية فوائد على محصول حبوبى. أنها قد تكون،على سبيل المثال،من الوهن بحيث لا يمكنها أن تنافس البكتيريا المتوطنة بالتربة، ومع ذلك،فقد كانت لمحاولات استخدام الوارثة الجزيئية لإنشاء سلالات من بكتيريا تعيش على جذور النبات،ذات قدرات محسنة لتثبيت النتروجين فرصة على أية حال للنجاح ، ويجب ألا يقتصر هذا الأسلوب على اختيار أنواع محسنة من البكتيريا المثبتة للنتروجين، فلا يوجد مبرر،لسبب عدم نقل جينات nif من بكتيريا كليبسلا الرئوية إلى بكتيريا أخرى تستعمر الجذور بأعداد كبيرة.

وقد تم التعرف حالياً على أن البكتيريا الجذرية هى المساهمة الرئيسة فى اقتصاد النتروجين فى العديد من نباتات محاصيل العالم الرئيسة، ما هو مستقبل استغلال التكنولوجيا الحيوية فى تعزيز التثبيت البيولوجى للنتروجين فى البقوليات؟ بعض التجارب التى قام بها مؤخراً دونالد فيليبس Donald Phillipsمن جامعة كاليفورنيا فى دافيز،على الرغم من أنها من غير المحتمل أن تكون تكنولوجيا عالية،أظهرت أن لدى طرق تربية النباتات التقليدية الكثير الذى يمكن أن تقدمه، وبالاختيار الواضح لنباتات البرسيم الحجازى التى تزدهر عندما

تنمو على نتروجين مثبت، وتنمو أيضاً أفضل عند تلقيحها بالبكتيريا الجذرية ، حصل فيليبس وزملاؤه بسرعة على نباتات ذات إنتاجية متزايدة وبروتين عالى، وقدرة على تثبيت النتروجين، وتبين النتائج أنه على الأقل بالنسبة لهذا البقـل،لا تعتمد القيود على كمية النتروجين المثبت كثيراً على البكتير بقدر ما تعتمد على النبات العائل.

وبالرغم من هذا،فقد لا تكون البكتيريا الجذرية موجودة فـى التربـة،أو إذا وجدت،فإنها لا تكون فعالة فى تثبيت النتروجين، وفى تلك الحالات، يجرى تلقيح البذور البقولية بالبكتيريا عن طريق دمجها فى غلاف بذرى، وتقوم عدة هيئات تجارية بتصنيع مثل هذه اللواقح، وفى الواقع، فإن كل عقد فول صويا أمريكـا الشمالية تسكنه سلالات بكتيريا جذرية ملقحة،لأن فول الصويا والكائن العضوى التكافلى المثبت للنتروجين،المتوطنان فى شرقى آسيا، غير موجـودين بصـفة عامة فى قارة أمريكا الشمالية.

كان استخدام البذور البقولية الملقحة ناجحاً إلى حد كبيـر ،خصوصـا فـى المناطق التى لا توجد بها سلالات من البكتيريا الجذرية المحلية،تستطيع أن تلقح البقل المطلوب تلقيحه، ومع ذلك، تظهر مشاكل خطيـرة عنـدما توجـد هـذه البكتيريا ، وبصفة عامة،يبدو أن السلالات الموجودة تتكيف بصورة أفضل لأن تكون عقد فى ظل ظروف الحقل الخاصة ، فقد ثبت من الواقع العملى أنه مـن الصعب جداً الإتيان بسلالات ملقحة لتشغل العقد، ولذلك، تعتبر المنافسة علـى تكوين العقد صفة مرغوبة لأى بكتيريا جذرية تستخدم للتلقيح .

ولما كانت أسس التنافس البيوكميائى والوراثى غير معروفة،فليس من الممكن فى الوقت الحالى التقرير بأن المعالجة الوراثية يمكن أن توجه إلى صنع سلالة أكثر تنافساً، على أن هذا يمكن أن يتم بصورة تقديرية ،إذا وجدت سلالتان مـن البكتيريا الجذرية : تثبت إحداهما قدراً كبيراً مـن النتـروجين،ولكن لا تكـون

متنافسة على تكوين العقد،و ينطبق على الأخرى العكس صحيح، فمجرد نقل د.ن.أ من سلالة منافسة لأخرى يخلق هجيناً،أى يكون كلاهما منافساً ومثبتاً نتروجينيًا فعالا، ويمكن أن يحدث هذا ،حتى لو كانت الطبيعة الدقيقة للجين المنقول أو الجينات غير معروفة.

وهناك أسلوب آخر لمشكلة التنافس، يمكنه أن يستغل التنوع الوراثى فى العائل البقلى بالإضافة إلى التنوع الوراثى الموجود فى البكتير، وعلى سبيل المثال،هناك سلالة بدائية من البازلاء تسمى بالنوع الأفغانى،فشلت فى تكوين عقد بواسطة معظم سلالات R.leguminosarum ،وهو البكتير التكافلى الطبيعى للبازلاء، وتتحدد مقاومة النبات لتكوين العقد بجين واحد متنحى، ومع ذلك،فهناك سلالة R.leguminosarum معينة،التى تم عزلها من تربة تركية،تكون العقد فى بازلاء النوع الأفغانى، بالإضافة إلى السلالات التجارية العادية، ويرجع امتداد سلسلة العائل للبكتير التركى ،إلى وجود جين واحد، فعندما ينقل هذا الجين إلى سلالة عادية من بكتيريا R.leguminosarum، فإنه يكسبها القدرة على تكوين العقد فى نوع البازلاء الأفغانى.

وتوحى هذه النتائج بأنه من الممكن من الناحية النظرية على الأقل تفادى مشكلة التنافس،عن طريق المعالجة الوراثية للنبات البقلى والبكتيريا الجذرية المكونة للعقد، وأولى الخطوات هى إدخال جين مقاومة تكوين عقد البازلاء الأفغانية فى سلالة بازلاء تجارية، والخطوة الثانية، هى نقل جينات سلسلة العائل للسلالة التركية من بكتيرياR.leguminosarum إلى سلالة تجارية نشطة من هذا البكتير، يمكنها أن تستخدم حينئذ فى تلقيح النبات المعدل، ويمنع وجود جين المقاومة فى النبات المحصولى تكوين العقد،التى تقوم بها مجموعة البكتيرياR.leguminosarum المتوطنة فى التربة،وعلى ذلك يقتصر شغل العقد

على السلالة البكتيرية الملقحة ذات السلسلة الممتدة من العوائل، ويمكن أن يطبق هذا الأسلوب بصفة عامة على الأنواع البقولية والجذرية الأخرى.

ومن الأفكار المقنعة الأكثر شيوعاً المعنية بتطبيق الأبحاث على تثبيت النتروجين البيولوجى،ربما تكون الأكثر إثارة- هى تطوير نباتات المحاصيل غير البقولية المثبتة للنتروجين، ويمكن تصور اثنين من السيناريوهات العامة لإنشاء هذه الكائنات العضوية الرائعة، فى السيناريو الأول،تطعيم جذور نباتات البطاطس والذرة والطباق بعقد جذرية تسكنها البكتيريا الجذرية المثبتة للنتروجين، والسيناريو الثانى، غرز جينات nif بشكل مباشر فى مجموعة العوامل الوراثية للنبات العائل.

واحتمالية إجراء هندسة وراثية للنباتات غير البقولية التى يمكنها تكوين العقد المثبتة للنتروجين احتمالية ضعيفة تماماً، فلا يعرف إلا القليل عن إسهام النبات فى تطوير العلاقة التكافلية مع البكتيريا الجذرية ، ولكن كما ذكرنا من قبل ،فإن عشرينات بل مئات الجينات النباتية تنشط بطريقة معينة داخل العقد، وبرغم كل إمكانات البيولوجيا الجزيئية والقدرة الإنمائية لإدخال جينات جديدة داخل النباتات(انظر الفصل الحادى عشر)،فيبدو أن هناك آمالاً محدودة لإدخال كل هذه الجينات المحددة للعقد فى النباتات غير البقولية،وجعلها تعبر بطريقة محكمة ومنسقة.

وفى المقابل،بدا أنه ليس هناك مبرر فنى لعدم إمكانية إدخال جينات nif من بكتيريا كليبسلا الرئوية فى النباتات وتعبيرها هناك، وعلى الرغم من أن هذا العمل سيكون مضيعاً للوقت،إلا أنه يمكن إقران الوحدات النسخية لجين nif بتسلسلات منظمة تسمح بتعبيرها فى النباتات، ويمكن وضع هذه الوحدات الإنشائية بعد ذلك فى متجه مثل Ti plasmid فى بكتير الأورام

الزراعي Agrobacterium tumefaciens، الذى يمكن استخدامه فى إدخال الجينات إلى مجموعة العوامل الوراثية لنبات سهل الانقياد، ومع ذلك،يعتبر هذا الجزء السهل.

ويجب أن يكون تنظيم جينات nif تنظيماً دقيقاً،بحيث تصنع منتجاتها العديدة بالنسب المضبوطة، بينما ما هو أهم من ذلك،أن تؤخذ فى الاعتبار،التأثيرات السامة للأكسجين على النتروجيناز التى تسبب مشكلة رئيسة، وستعبر هذه الجينات إلى حد ما فى نبات ذا تركيز قليل من الأكسجين، وتحتوى أنسجة كهذه على أجزاء رئيسة من أعضاء تخزين كبيرة(درنات البطاطس،على سبيل المثال)،داخل البذور المنبتة ومناطق الجذور، وعلى ذلك،فمن المفضل جعل جينات nif المعبر عنها من التسلسلات المنظمة أن تنشط فى هذه الأنسجة النباتية اللاهوائية.

وعلى الرغم من القيام بهذه الأنشطة،فلا يزال هناك أشياء أخرى لا يمكن تقديرها بدقة، هل سيتجمع إنزيم مركب نتروجيناز بصورة صحيحة فى البيئة الغريبة؟ هل الأمونيا التى ستثبت،يمكن أن تمثل هضمياً فى نفس المكان؟ إن لم يحدث هذا،فيحتمل أن تتسرب للخارج،وأخيراً،وحتى مع نجاح تثبيت النتروجين،هل ستكون متطلبات الطاقة كبيرة جداً،بحيث تقلل غلة النبات إلى مستويات غير مقبولة؟ هذه الأسئلة وأسئلة أخرى يجب أن توضع فى الاعتبار، والشيء المثير هو ،إن البيولوجيا الجزيئية للنبات قد تطورت بسرعة خلال السنوات القليلة الماضية،حتى أن البروتوكولات التجريبية لدراسة هذه الأسئلة،ستكون قريباً فى متناول المختصين.

الفصل العاشر

زراعــة الخــلايا والأنسجة النباتية
Plant cell and tissue culture

تعد زراعة الخلايا والأنسجة النباتية عنصراً بالغ الأهمية فى معظـــم أوجـــه التكنولوجيا الحيوية النباتية،إذ تعتمد سلسلة كبيرة من التطبيقات النباتية على قدرة الخلايا والأنسجة النباتية على النمو فى محاليل غذائية بسيطة معروفة التركيب ، وتشمل هذه التطبيقات تكاثر النبــاتplant propagation، وحفــظ وتخــزين البروتوبلازم الجرثومى(الأصل الوراقى للمادة النباتية)،الذى يعول عليــه فــى الاحتفاظ بمجاميع جينات النباتات التى لا تكون فى حالة زراعة نشــطة،وإنتاج المواد الكيميائية المفيدة من الناحية التجارية،والهندسة الوراثيـــة النباتيـــة plant genetic engineering.

وترجع أصول طرق استزراع الخلية النباتية إلى أوائل القرن العشرين،عندما أوضح جوتليب هابرلاندت Gottleib Haberlandt ،أنه يمكن الاحتفـــاظ بـــأنواع معينة من الخلايا النباتية فى ظروف صحية جيدة فى مزرعة، وعلى الرغم من أن الخلايا لم تنقسم إلا أن أبحاثGottleib Haberlandt قد حددت معالم الطريق للأبحاث التى ستأتى فى المستقبل.

إلا أن عدم القدرة على جعل الخلايا النباتية المستزرعة تنقسم ظــل الشــغل الشاغل لسنوات عديدة، ولم تدخل طرق العلم المنهجية العصر الحديث إلا فـــى فترة الخمسينات، وفى منتصف هذا العقد،اكتشف فولك سكوج Folke Skoogمن جامعة ويسكونسن فى ماديسون، السيتوكينيناتcytokinins،وهى مجموعة مـــن

الهرمونات النباتية لها عدة تأثيرات مختلفة،تشمل تحفيز انقسام الخلية، بالإضافة إلى ذلك،فقد وجد روبرت جوثريت Robert Gautheret من جامعة بيير وماري كوري في باريس بفرنسا،أن الأوكسينات auxins[1]،وهي مجموعة أخرى من الهرمونات النباتية تحفز على انقسام خلايا الكالوس[2]، والكالوس كتلة غير متميزة من الخلايا تتكون على جرح النبات،وتنتجه أيضاً الأنسجة النباتية في مزارع الأنسجة(شكل ١٠-١).

[1] ـ أكسين :هرمون النمو،اصطلاح عام يطلق على مواد عضوية لها تأثير مؤات أو غير مؤات لنمو النباتات،وذلك عندما تكون تلك المواد فى تركيزات خفيفة،(معجم المصطلحات الزراعية للشهابى). المترجم

[2] ـ الكالاس:نسيج ينمو بعد جرح يحصل فى الشجرة ويفضى إلى تغطية ذلك الجرح،(معجم سابق ذكره).المترجم



شكل ١٠-١ صورة لمزرعة نسيج كالوس من صنف طماطم برى، تبدأ النباتات فى التجدد من خلايا كالوس

وبإضافة السيتوكينينات والأوكسينات إلى وسط النمو،الذى يحتوى أيضاً على الأملاح والسكر، أصبح فى مقدور البـــاحثون زراعـــة الخلايـــا النباتيـــة فـــى المزرعة،وليس مجرد الاحتفاظ بها هناك، وقد تعلموا أيضاً،أنه فى العديد مـــن الحالات، يمكن تجديد النبات كله من الكالوس أو من الأنواع الأخرى من الخلايا النباتية التى تنقسم فى المزرعة، وتعتبر القدرة على تجديد النباتات شرطاً أساسياً فى العديد من تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للنباتات الجارى فحصها .

وفى مقالة نشرت فى عام ١٩٥٨،كتب كل من ألبـــرت ريكـــرAlbert Riker وألبرت هلدربرانتAlbert Hilderbrandt من جامعـــة ويسكونســـن،أن طـــرق استزراع الخلية النباتية فتحت الطريق أمام العديـــد مـــن الأبحـــاث التطبيقيـــة والأساسية للنباتات، ويمكن البدء فى تطبيق الأساليب التى استخدمت بنجاح فى دراسة الوراثة الجزيئية للكائنات المجهرية على أنسجة الخلايا النباتية الراقيـــة، وعلى الرغم من أن ريكر وهلدربرانت كتبا مقالتهما قبل مجـــيء التكنولوجيـــا الحيوية بالصورة التى نعرفها اليوم،وحتى قبل أن تداول مصطلح التكنولوجيـــا الحيوية،إلا أن تنبوء هما كان يتضمن ما يؤيد أقوالهما.

ويعد مجال التكنولوجيا الحيوية النباتية من المجالات المزدهرة حالياً،والعديد من طرق زراعة الخلايا والأنسجة النباتية قد أنتجت أو يحتمل أن تنـــتج فـــى المستقبل القريب منتجات أو نباتات مفيدة، ويجرى استخدام الطرق فى اســـتيلاد أنواع نباتية جديدة وفى إنتاج المركبات المهمة التى يصعب الحصول عليها من التخليق الكيميائى، وتتساوى أهمية القدرة على استزراع الخلايا النباتيـــة مـــع استخدام أساليب الهندسة الوراثية لإدخال جينات جديدة إلى الأنواع النباتية.

استخـــدام مزرعـــة الخليـــة فى إكثار النبـــات

The use of cell culture for plant propagation

استحدثت زراعة الأنسجة أساساً من أجل تسهيل عملية التكاثر الاستنساخى للأصناف البستانيةhorticultural species، ففى طريقة التكاثر الاستنساخى تتكاثر النباتات بطريقة لاجنسيةasexually،بحيث تتطابق جميع الأفـــراد الجديـــدة مـــع النبات الأصلى،أى أن جميع الأفراد تكون أعضاء من مستنســـخ واحـــدclone، واكتسب بستانيو الحـــدائق خبـــرة طيبـــة مـــن التجـــارب الشـــائعة للتكـــاثر الاستنساخى،مثل تكاثر البنفسج الأفريقى الجديدnew African violet أو نباتـــات الفلودندرونphilodendron من عقل الشتلات ، وتفلح هذه الطريقة مع نباتـــات الزينة،لأن العديد من النباتات،خصوصا المهجنة منها،إمـــا لا يمكـــن تربيتهـــا بطريقة جنسية أو أنها إذا تكاثرت جنسياً فإنها تفقد بعض الصفات المرغوبة التى تربت فيها.

وعلى سبيل المثال،تحتوى مجموعة أشجار زيت النخيل عادة،شجرة أو اثنتان متوفقتان على الأخريات،وتسمى بشجرة نخبةelite tree، فإذا تكاثرت الأشـــجار النخبة بطريقة جنسية،فسوف تفقد صفاتها الفائقة، واستطاع لورى جونز Laurie Jonesمن مؤسسة يونليفر فى بدفورد بانجلترا فى الآونة الأخيرة إكثار أشـــجار زيت النخيل النخبة باستخدام طرق زراعة الأنسجة،ونتيجة لذلك فتح الطريـــق أمام إكثار الأشجار دون أن تفقد صفاتها الفائقة.

وإنتاج "البذور التخليقية"synthetic seeds ، يعد وسيلة أخرى من وسائل إكثار النباتات التى لا تخضـــع للإكثـــار الجنســـى، حيـــث يمكـــن إكثـــار الخلايـــا

الجسديةsomatic cells لبعض النباتات فى المزرعة،وبعد بذلك تستحث على تكوين الأجنة، (والخلايا الجسدية لكائن عضوى،هى جميع الخلايا،عدا الخلايا الجرثومية)،وتنتج البذور التخليقية عن طريق تغليف الأجنة بغطاء وقائى،يجعلها تعامل تقريباً كالبذور التقليدية.

ولما كانت الأجنة النباتية تنمو فى مستعلق مزرعيsuspension culture،فإن الطريقة تناسب إنتاج بذور تخليقية بمقادير كبيرة، ويمكن أن يتم الاستزراع فوراً فى مفاعلات حيوية ذات مرشح دوارspin-filter bioreactors ،تسمح بفصل الأجنة من سوائل المزرعة بطريقة سهلة، وهناك مزايا عديدة لهذه الطريقة تشمل التحكم البيئى والقدرة على إنتاج كميات كبيرة غير محدودة من الأجنة، ومع ذلك فهناك بعض العيوب التى يجب التخلص منها، وتشمل هذه العيوب على التكاليف العالية للوسط المزرعى وعدد الأنواع المحدود الذى سيكون أجنة فى المزرعة.

ويرى علماء الأمراض النباتية plant pathologistsأيضاً أن طرق زراعة الخلايا والأنسجة النباتية من الطرق المفيدة، فعلى سبيل المثال،يمكن أن يستخدم هؤلاء الباحثون هذه الطرق لإنتاج المجموعات المنتظمة من الخلايا التى يحتاجون إليها فى دراسة تأثيرات المسببات المرضية للنبات، ويمكن من بين أشياء أخرى،حث بعض صور الخلايا المستزرعة على الانقسام بطريقة متزامنة،ذلك الموقف الذى يسهل دراسة البيولوجيا الجزيئية للعدوى الفيروسية وتكرارها.

ويأتى التطبيق الآخر لطرق زراعة الخلية فى إنتاج سلالات نباتية خالية من الأمراض، حيث يمكن أن تعقم الخلايا النباتية المستزرعة للتخلص من البكتيريا

ومسببات الأمراض الأخرى التى تحدث أحياناً عدوى مستديمة للنباتات كلهــا، وقد أمكن الحصول بهذه الطريقة على سلالات خالية من مسببات الأمراض من أعشاب علف الماشية والبقوليات ، بالإضافة إلى ذلك، تعتبر طريقــة الحفــظ بالتبريدcryopreservation،التى تجمد من خلالها الخلايا النباتية المستزرعة مــن أجل التخزين،وسيلة لحفظ أنواع نباتية غير عادية لفترات طويلة.

نشوء التباين فى مزارع الأنسجة

The generation of somaclonal variation in plants

على الرغم من أنه يجرى استخدام أساليب زراعة الخلية فى إكثار النباتات بطريقة استنساخية، ومن ثم الحفاظ على صفات مرغوبة فى الذرية،إلا أنه غالباً ما تحدث نظم الاستزراع تغييرات وراثية فى النباتات الناتجــة مــن الخلايــا المستزرعة، ويوجد حالياً اهتمام كبير بهذا التغير،الذى ربما يقدم طريقة لإنتاج صفات مرغوبة جديدة فى أنواع متوطنة من الأنواع المحصــولية، كالاهتمــام الموجود فى الإبقاءِ على الثبات خلال التكاثر الاستنساخى.

والتغير الذى يحدث فى النباتات التى تجددت عن طريق أنســجة أو خلايــا مستزرعة،يأتى كشيء مفاجيء، فكل الخلايا الجسدية من نبات واحــد،يجب أن يكون لها نفس التركيب الوراثى،وكان يتوقع من النباتات المتجــددة مــن هــذه الخلايا أن تكون متماثلة ، وبدلاً من ذلك، فإنها غالبًا ما تبدى قدر كبيــر مــن التنوع فى صفاتها، هذا التغير الاستنساخى الجسدى كما يطلق عليه،لم يعرف أنه تغير كلى الوجود إلا مؤخراً فى عام ١٩٨١، وعلى الرغم من أن أسباب التغير

الاستنساخى الجسدى لم يتم معرفته بدقة ،إلا أنه من المحتمل أنه ينشأ كنتيجـــة لتغير وضع الــــ د.ن.أ

وقد كان يعتقد منذ أربعين عامًا مضت أن المادة الوراثية فى غايـــة الثبـــات عندما اكتشفت باربرا ماكلنتوكBarbara McClintock من معمل كولد ســبرنج هاربر فى لونج أيلاند بنيورك العناصر الانتقالية"transposable elements" فى نبات الذرة ، تلك العناصر التى قد توجد فى كل الأنواع،هى عبارة عن قطع من د.ن.أ،تنتقل من مكان لآخر فى مجموعة العوامل الوراثية،وتسبب أحياناً طفرات عندما تدخل فى الجينات وتمزقها، ويمكن أن تنعكس الطفــرات أيضــاً إذا مـــا غادرت العناصر الجينات الممزقة، وعلى ما يبدو فإن الظروف المستخدمة فـــى زراعة الأنسجة النباتية تحفز على تحرك العناصر الانتقالية،وتؤدى بالتالى إلى تغير استنساخى جسدى بصورة متكررة فـــى نباتـــات تتكـــاثر مـــن الخلايـــا المستزرعة.

ويوضح التغير الاستنساخى الجسدى الحادث فى نباتات الخـــس والطمـــاطم كيف يمكن استخدام زراعة الخلايا والانسجة لهذا الغرض، وقامـــت كريســـتين برونChristine Browne وجون لوكاسJohn Lucas وبراين باورBrian Power بإجراء تجارب على الخس فى جامعة نوتنجهام فى انجلتــرا،ومن أجـــل هـــذا البحث،قام الباحثون فى البداية بإنتاج كالوس من كل من أنواع الخس الثلاثة،عن طريق استزراع الفلقات (وهى الأوراق الأولى الناتجة من إنبـــات البـــذرة)، أو الأوراق البالغة النضج، وبعد ذلك جدد برون ولوكاس وباور النباتات كلها من

نسيج الكالوس بواسطة إجراء سريع فى خطوة واحدة طوره الباحثون من أجل الخس.

وكانت الخطوة التالية،هى زراعة النباتات المجددة تحت ظروف كل من الصوبة الزجاجية glasshouseوالحقل،من أجل تقييم ذرية النبات فى التغير فى عدد من الصفات،تشمل على التشكل ووزن البذرة ونشاط النبتة والتفاعل مع اثنين من أمراض الخس، فطر العفونة الناعم وفيروس فسيسفاء الخس lettuce mosaic virus.

وأظهرت النباتات المتجددة لأنواع الخس الثلاثة،تغيرا استنساخيا جسديا فى هذه الصفات مع نشاط ضعيف وإغراب[٤] albinism، وتغيرات فى محتوى كلوروفيل صبغة النبات، وتغيرت النباتات أيضا فى تفاعلاتها مع فطر العفونة الناعم وفيروس فسيسفاءالخس:فالبعض كان أقل استجابة لمسببات الأمراض، وكان البعض الآخر أكثر استجابة، وأظهرت إحدى السلالات النباتية توليفة تسترعى الاهتمام من غلة متزايدة ومحتوى كلوروفيللى بالإضافة إلى أزهار مبكر.

وهذه الصفات ليست بالجديدة،ولكن السهولة التى يمكن أن تسترد بها بعد زراعة النسيج،تتناقض مع التغير قليل الحدوث الموجود فى تجارب التربية التقليدية، فتكرار التغير الذى تحث عليه زراعة الخلية،يعتبر أكبر مما يمكن الحصول عليه من تعريض النباتات للإشعاع أو المعالجات الكيميائية التى تسبب

[٤] ـ إغراب: حصول حؤولة مفاجئة فى لون النبات، والإغراب غير اليرقان، وهو يحصل أيضاً فى الحيوان.

الطفرات الوراثية. وعلاوة على ذلك،فإنه يبدو أن لمرحلة التجديد تأثير تنظيفى يساعد على إلغاء التغيرات الضارة.

ومع ذلك،فالتغير على الرغم من أنه يستحث إلا أنه يمكن أن يكون ضاراً بالنبات عن أن يكون مفيدًا له،لكنه من الواضح أن النباتات لا تتجدد بسهولة من خلايا مستزرعة مرت بتغيرات ضارة، كالنباتات التى تتجدد من خلايا ذات تغيرات مفيدة، وعلى أية حال،فعندما تزرع النباتات بطرق الزراعة التقليدية،فإنه يجب فحص عدد كبير منها لاكتشاف التغير الذى يكافئ لما ينشأ أثناء نظم الاستزراع.

وقد يكون لنباتات الخس التى تظهر التغير الاستنساخى الجسدى إمكانية تحسين نوع المحصول،. وعلى سبيل المثال، يمكن استخدام فالسلالة التى لها ميزات مثل المقاومة المتزايدة لفطر العفونة وفيروس فسيفساء الخس وغلة متزايدة فى برامج التربية التقليدية التى تستهدف إنتاج أنواع أفضل من الخس، ويمكن أن تثبت ميزة الإزهار المبكر أيضاً أنها ميزة مفيدة فى هذا الخصوص من خلال تقليل فترات التناسل، وتبرز هذه الأمثلة حقيقة أن إجراءات زراعة النسيج الجديد تقدم إضافة لطرق التربية التقليدية؛وهى نادراً ما تستخدم كتكنولوجيات بديلة.

وتوضح أيضا أبحاث الخس لمجموعة نوتنجهام،حقيقة أن الإجراءات السريعة والبسيطة تفضل دائماً،ويمكن أن يكون لها أحيانا مميزات واضحة، وقد استخدمت دراسات التغير الاستنساخى الجسدى السابقة جبلات الخلايا النباتيةprotoplasts (شكل ١٠-٢) -وهى خلايا نباتية أزيل منها جدران الخلية

الصلبة - بدلاً من نسيج الكالوس، ومع ذلك،أظهرت تجارب بـــراون ولوكـــاس وباور أن تجديد نباتات الخس من الكالوس يتفوق على تجديدها مـــن جـــبلات الخلايا النباتية، وتعتبر نظم جبلة الخلية النباتية مضيعة للوقت بالمقارنة بالتجديد من الكالوس بالطريقة الجديدة التى طورتها مجموعة نوتنجهام، وعـــلاوة علـــى ذلك، يمكن تجديد أنواع أقل من الخس من جبلات الخلايا النباتية عن تجـــددها من خلايا الكالوس.

ولما كان التكرار٥ وأنواع التغير المرصودة فى المتجددات مـــن الكـــالوس تشابه مثيلتها الموجودة فى المتجددات من جبلة الخلية النباتية،فيتضح أن استخدام جبلات الخلايا النباتية غير ضرورى، وعلاوة على ذلك ،كانت جميـــع نباتـــات الخس المتجددة من الكالوس ثناية الصبغياتdiploid؛أى أن لها المجموعة الكاملة الطبيعية من الكروموسومات، وعلى النقيض،كانت نسبة عالية من المتجـــددات من جبلة الخلية النباتية رباعيـــة الصـــبغياتtetraploid، لهـــا ضـــعف عـــدد الكروموسومات التى يجب أن تكون فيها،وأظهرت خصوبة ضعيفة، وعادة مـــا يتضاعف عدد الكرموسومات عندما تستعد الخلايا للانقسام،وقد تصبح جـــبلات الخلايا النباتية رباعية الصبغيات،لأن خليتين وليدتين فشلتا فـــى التكـــون بعـــد التضاعف، وفى غير ذلك ،فإن جبلات الخلايا النباتية قد تنـــدمج مـــع بعضـــها البعض.

والطريقة التجريبية لنشوء التغير الاستنساخى الجسدى فـــى الطمـــاطم،التى تصنف من بين أعلى ثلاثين محصول عالمى(شكل ١٠-٣)،قد تضمنت إلى حد

٥ــ تكرار: (فى علم البيئة: قياس وفرة "غزارة" نوع نباتى فى جماعة نباتية مختلطة، ويميزون عمومـــاً ســـت طوائف من التكرار، ويفصلون بعضها عن بعض إما بالنظر أو بوسائل أدق منه، وهذه الطوائف هـــى: الـــوافرة جدًا، والوافرة، والمترددة، والطارئة، والموضعية، والنادرة.

بعيد الأوراق اليافعة الكاملة الممتدة والمأخوذة من نباتات زرعت فى الصـــوبة الزجاجية glasshouse، وزرعت منفصلات نباتية Explants[1] من الأوراق فـــى وسط يعرف بأنه يسمح بتجديد هذه المنفصلات النباتية ، وقد كان هناك تـــأثير بسيط للتغير الاستنساخى الجسدى على نباتات الطماطم المتجددة من الكالوس أو من جبلات الخلايا النباتية، حيث لم تستجب معظم الأنواع لأساليب تجديد جبلـــة الخلية النباتية.

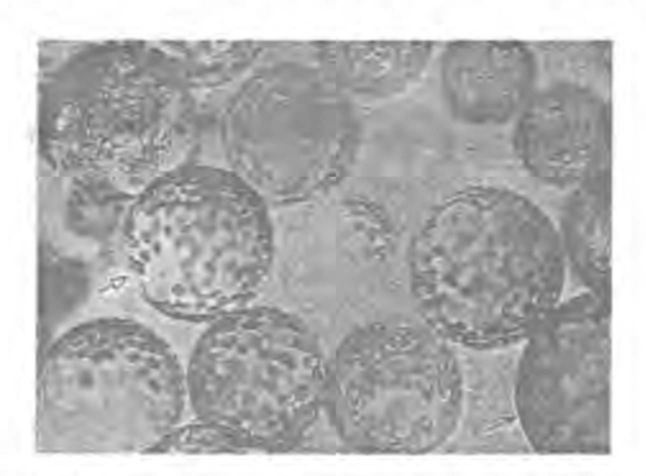
وأجرى كل من دافيد ايفانز David Evans ورودريك شارب Roderick Sharp وزملاؤهما فى مؤسسة تكنولوجيا د.ن.أ النبات (DNAP) فى كينامنسون بولاية نيوجرسى، دراسة مستفيضة على المنفصلات النباتية لورق الطماطم المستزرع، وكما هو الحال عادة فى النباتات المتجددة من النسيج المستزرع، أظهرت نباتات الطماطم التى تم الحصول عليها من المنفصلات النباتية الورقية تغيرات فى عدد الكروموسومات.

وأظهرت نباتات الطماطم المتجددة أيضاً درجة عالية من التغير الاستنساخى الجسدى، وكان الأكثر إثارة للاهتمام بشكل خاص اكتشاف طفرات الجين الواحد فى النباتات التى تجددت من الجزء النباتى المزروع من الأوراق مـــن أنـــواع عديدة، وكان تكرار الطفرات التى حدثت بشـــكل تلقائـــى فـــى ظـــل ظـــروف المزرعة،تكراراً عالياً بنسبة ١ لكل ٢٠ مـــن النباتـــات المتجـــددة، واشـــتملت الطفرات فى الجينات النووية على أنواع سائدة ونصف سائدة ومتنحية. وربمـــا

[1] ـــ منفصل نباتى :نقل نسيج حى إلى غير بيئته لغرض علمى.(المترجم)

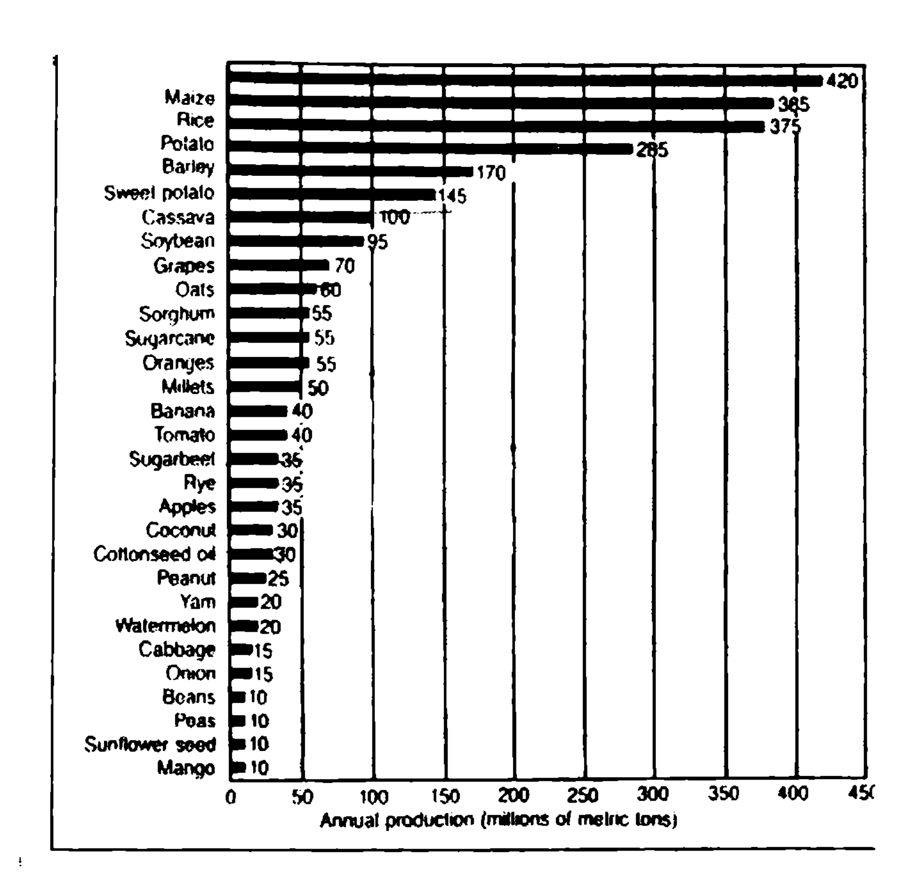
توجـد الطفـرات أيضـاً فـى الجينـات الموجـودة بـداخل جبـيلات اليخضور٧ chloroplasts

بالإضافة إلى ذلك، فقد كانت هناك بعض الأدلة علـى أن طفـرات الجـين الواحد لنوع لم يكن موجوداً من قبل بعد تعريض النباتات للمعالجـات المسـببة للتحول الخلقى التقليدية بواسطة المواد الكيميائية أو الإشعاع،يمكن استعادتها فى نباتات الطماطم المتجددة، ومن بين هذه الطفرات، الطفرات الناتجة عن طماطم ذات محتوى عال من المواد الصلبة،وهى سمة مهمة فى تصنيع الطماطم، وهذا يوضح ميزة استخدام طرق زراعة الأنسجة لإحداث تغيرات طفيفة فـى نـوع نباتى تكون فيه تغيرات أخرى غير مرغوبة، ويمكـن اعتبـار هـذا التغيـر الاستنساخى الجسدى بأنه الشكل الأكثر اعتدالاً من التلاعب الوراثى.



شكل ١٠-٢ صورة مصغرة لجبلات خلايا تم عزلها من أوراق نوع طماطم برى، وتحضر جبلات الخلايا بالإذابة الإنزيمية لجدران خلايا النبات الصلبة المحتوية على السيلليوز، والحبيبات الصغيرة الخضراء داخل هذه الجبلات الخلوية هى جبيلات اليخضور،التى تحتوى على الصبغ الكلوروفيللى الأخضر، وتقوم بعملية التمثيل الضونى.وقد يمكن إدماج جبلات خلوية لأنواع نباتية مختلفة من خلايا جسدية مهجنة، وهذه هى الطريقة الجديدة للحصول على الهجن من أنواع النبات التى لايمكن تهجينها بطرق التربية التقليدية شريطة أن يمكـن تجديـد النبات كله من جبلات خلايا الهجين، بالإضافة إلى ذلك يمكن إجراء الهندسة الوراثية النباتية عن طريق إدخال جينات فردية مستنسـخة إلى جبلات الخلايا، ويتوقف نجاح هذا التطبيق أيضاً على القدرة على تجديد النباتات كلها من جبلات الخلايا.

٧ــ جبيلات اليخضور :وتسمى أيضًا حبيبات اليخضور،هى جبيلات خضر كروية فى الأعم مصطبغة باليخضور تكون فى جبلة الخلية.



شكل ١٠-٣ مخطط يوضح أعلى ٣٠ محصول عالمى(باستبعاد النباتات العشبية^٨)، وتظهر فى المقدمة،الحبوب والقمح والأذرة والأرز، وتأتى البطاطس في المرتبة الثانية فى القائمة ذات معدل إنتاج سنوى يصل إلى ٢٨٥مليون طن مترى، والإنتاج السنوى للطماطم الذى يصل ٤٠مليون طناً مترياً،يجعل هذا المحصول فى المرتبة السادسة عشر من القائمة.

ولما كان التغير الاستنساخى الجسدى أساساً بسيطاً ويسهل الحصول عليه، فليس من المدهش أن يكون له حاليا دور مهم فى تطبيقات التكنولوجيا الحيوية علـــى زراعة الخلية والأنسجة النباتية ، ومن بين الجهود البارزة بالإضافة إلى الجهود

^٨ــ نبات عشبى: يتميز بأوراق نصلية وساق عقدية ويشمل أنواع الحنطة والدخن وقصب السكر وسواها.

المبذولة لتحسين الخس والطماطم، التطبيقات الموجهة نحو تحسين المحاصـــيل المتكاثرة خضرياً ،التى غالباً ما تتحدى طرق التكاثر التقليدية والوراثية.

وتنافس محاصيل عالمية قليلة البطاطس كهدف للتحســين بواســطة التغيــر الاستنساخى الجسدى، وعادة ما يتكاثر هذا المحصول تكاثراً خضرياً،ومن أفضل الأنواع تلك الأنواع النشطة جنسياً.وتطوير سلالات أفضل من البطاطس المنتجة للاستخدام التجارى يعد اهتماماً رئيساً فى صناعة تصنيع الغذاء، وعلى ســبيل المثال، يوجد بالمملكة المتحدة نوع من البطاطس يسمى بـــRecord، يــزرع بموجب عقد يقتصر على إنتاج بطاطس القلى، غيــر أن نــوعRecord قليــل الإنتاجية، إذ يتعرض لبعض الأمراض ويراكم سكريات مختزلة، تجعــل لــون البطاطس يميل للون الداكن ولا تصلح للتخزين.

ويجرى حالياً تقييم التغير الاستنساخى الجسدى فى النباتات المتجددة من نوع الـــRecord،وأيضاً من سلسلة أخرى من أنواع البطــاطس ذات أهميــة فــى صناعة الأغذية، وبضم هذه التقييمات إلى بعضها،فإن الدراسات التــى تجــرى على التغير الاستنساخى الجسدى فى عدة أنواع نباتية تتحــدى وجهــة النظــر التقليدية التى تعتبر أن الطفرات الجسدية نادرة وقليلة الأهمية فــى ديناميكيــات المجموعة النباتية.

القيود المفروضة على طرق زراعة الخلية النباتية

The limitations of plant cell culture methods

لا تعنى التطبيقات الناجحة لطرق زراعة الخلية النباتية فى إكثار النبات ونشوء التغير الاستنساخى الجسدى أن جميع المشكلات قد حلت،أو أن الباحثين يستطيعون الآن عمل كل شيء يودون عمله عن طريق التكنولوجيا، وأبرز توماس أورتونTomas Orton منDNAP سذاجة الفكرة البسيطة فى أن كائنات عضوية متعددة الخلية،مثل النباتات،يمكن جعلها تتصرف كالكائنات المجهرية، فإذا أمكن ذلك،فسوف يتمكن الباحثون من إحداث طفرات فى الخلايا النباتية،واختيار الصفات المرغوبة، وتمييز الطفرات الجديدة، كل ما فى المزرعة،والدخول فى عصر جديد لفهم تركيب ووظيفة الانتظام التطورى للجينات النباتية.

بيد أن الخلايا النباتية لا تسلك مسلك الكائنات المجهرية فى المزرعة، فالخلايا البكتيرية على سبيل المثال، تنفصل عند انقسامها مكونة وحدات متكافئة ، فى حين لا تسلك الخلايا النباتية هذا السبيل؛ فالخلايا الوليدة تظل مرتبطة وتشكل كتلة خلوية، وستكون الخلايا التى ستوجد داخل كتلة الخلية فى بيئة مختلفة تماماً عن الخلايا الموجودة خارجها،وسوف لا تتعرض لنفس ظروف الانتخاب، وعلى سبيل المثال، لن تتوفر المواد الغذائية والمكونات الأخرى فى الوسط المزرعى بدرجة كبيرة للخلايا الداخلية.

وصعوبات كهذه تناولتها أعداد كبيرة من الدراسات المعنية بانتخاب أفضل للمحاصيل النباتية من الخلايا المستزرعة،بحيث أنه يوجد حالياً تقدير جيد للقيود

المفروضة على التكنولوجيا ، وبالإضافة إلى ميل الخلايا النباتية لتكوين كتل فى المزرعة،فإن هذه القيود تشمل على عدم القدرة على تجديد العديد من أنواع المحاصيل النباتية من الخلايا المستزرعة، ولا يزال موضوع تجديد النبات مجرد فن أكثر من أن يكون علماً ، وحتى إذا تجددت بعض أنواع معينة من النباتات،فقد لا تجدد الأنواع الأخرى، وقد يكون إيجاد ظروف مناسبة للتجديد مسألة مضيعة للوقت.

وبالنسبة لاختيار الطفرات المفيدة من الناحية الزراعية من مزارع الخلية النباتية،فقد قام روى شالفRoy Chaleff من E.I Dupont de Nemours وشركة فى ولمنجتون بدلاوار بالملاحظة وثيقة الصلة بالموضوع ،وهى إمكانية التعرف بسهولة على الصفات الوحيدة التى تعبر على المستوى الخلوى ، وعلى ذلك،وعلى الرغم من أن بعض الصفات أحادية الجين، مثل احتمال المعادن الثقيلة والأملاح ومبيدات الحشائش،قد يمكن اختيارها للمزرعة، فقد تحكم صفات مرغوبة أخرى، مثل الإنتاجية العالية وفترة الإزهار ،العديد من الجينات ولا تخضع فى الوقت الحاضر لهذه النوعية من الطرق.

وعلاوة على ذلك،فحتى إذا انتخبت خلايا ذات مقاومة متزايدة للأملاح أوالمعادن الثقيلة أو مبيدات الأعشاب،فهذا لا يعنى بالضرورة أن كل النباتات المتجددة من هذه الخلايا سيكون لها نفس المقاومة ، فقدرة النبات على تحمل تركيزات الأملاح العالية،على سبيل المثال، ستعتمد إلى حد بعيد على قدرة جذوره على منع امتصاص الملح عن الاعتماد على مقاومة خلاياه الفردية للملح.

ومعظم الصفات المهمة من الناحية الزراعية تعتبر حتى الآن فقيـرة الفهـم حتى تسمح باستنباط استراتيجيات فعالة لانتخاب النباتات المحسـنة فـى نظـم المزرعة، ومع ذلك،فالدراسات الأساسية التى تجرى حالياً مع الخلايا والأنسجة النباتية المستزرعة،يجب أن ينشأ عنها فهم جيد لهذه الصفات، والدراسات القائمة على الطفرات المختارة من نظم زراعة الأنسجة،يحتمل أن تزيد مـن معرفـة تطور النبات ومن الأسس الفسيولوجية والوراثية لسلسلة من الاستجابات النباتية، وسوف يساعد هذا على وضع أساس جيد للمعالجات الوراثية العديدة التى تمـد فى الوقت الحالى بالقوة الدافعة الرئيسة للتطورات الجديـدة فـى التكنولوجيـا الحيوية للنبات.

إنتاج الهجين بإدماج جبلة الخلية النباتية

Hybrid production by protoplast fusion

بالإضافة إلى استخدام زراعة الأنسجة والخلايا النباتية فى تكـوين الأجنـة والأنواع الأخرى من الإكثار النباتى الاستنساخى،كمصدر للتغير الاستنسـاخى الجسدى،فإن هناك تطبيق متزايد للتكنولوجيا لإنتاج نباتات الهجين عن طريـق إدماج جبلة الخلية النباتية، ويجب أن تستخدم جبلات الخلايا النباتية فـى هـذه التجارب لأن الخلايا التى تحتفظ بجدرانها لن تكون قادرة على الاندماج. وقـد استقرت حالياً التكنولوجيا الأساسية لعزل جبلة الخلية النباتية وإدماجها، وعـادة ما تزال جدران الخلية عن طريق هضمها بخليط من الإنزيمـات تقـوم بهـدم مكونات جدار الخلية، ويمكن إحداث دمج جبلة الخلية النباتيـة ،إمـا كيميائيـاً بواسطة مواد مثل بوليثيلين جليكول ،أو باستخدام مجال كهربى.

والتحدى الباقى هو استخدام هذه التكنولوجيات بطريقة تفى بالغرض لتحسين النباتات، وتشمل قيود البحث الحالية ، الصعوبات القائمة فى تجديد النباتات من جبلات الخلايا النباتية المستزرعة، وفى انتخاب الهجن التى تنتج من عمليات الدمج . والتغلب أو تجنب هذه المشاكل يساوى فى أهميته التطورات الأخرى فى التكنولوجيا الحيوية.

وتقدر قيمة التحديات بشكل جيد من خلال الأخذ فى الاعتبار بعض التطبيقات المتوقعة من دمج جبلة الخلية النباتية، وعلى سبيل المثال،فغالباً ما كانت تبرز أهمية تحسين الأرز،الذى يعتبر من أهم المحاصيل الحبوبية العالمية، وقد يمكن تحقيق المقاومة المعززة للأمراض وتحمل الأملاح من خلال دمج جبلات الخلية النباتية لسلالات الأرز المنزرع مع أنواع الأرز البرى، بالإضافة إلى ذلك،فقد يمكن دمج جبلة الخلية النباتية النقل المباشر لعقم الذكر السيتوبلازمى بين السلالات، هذه الصفة، التى يبدو أنها مشفرة فى مجموعة العوامل الوراثية الميتوكوندرية،تمنع النبات من إنتاج اللقاح،وبذلك تمنعه من إلقاح نفسه، ويعتبر منع التأبير الذاتيself-pollination صفة مرغوبة لدى مربى النباتات الذين يرغبون فى إنتاج هجن بواسطة التلقيح الخلطيcross-pollination مع النباتات الأخرى، وإلا فعلى المربين أن يسلكوا المهمة الشاقة فى التخلص من الأعضاء المنتجة للقاح فى النباتات التى يربونها.

غير أنه قبل إمكانية تنفيذ أى من هذه الأفكار،فهناك حاجة إلى تجديد نباتات الأرز كلها بطريقة تناسلية من جبلات الخلايا النباتية، وقد بذلت جهود عديدة لتحقيق هذا الهدف،فى حين كانت النتائج فى معظمها مشكوك فيها ، ولما كانت جبلات خلايا نبات الأرز التى عزلت بطريقة مباشرة من النبات لا تقوم بأى تكاثر تناسلى يعول عليه ،فقد استخدم الباحثون جبلات الخلايا النباتية المعزولة من مزارع الخلية المعلقة، غير أن هذه المستحضرات قد تحتوى على خلايا

ملوثة ذات جدران سليمة،قد تكون هى نفسها قادرة على إجراء انقسام مقبول ،وفى النهاية تجدد فى النبات كله، وهذا يعنى أنه يمكن أن تأتى أية نباتات مجددة من خلايا سليمة، لن تكن قادرة على الاندماج وليست من جبلات الخلايا النباتية.بيد أنه فى الآونة الأخيرة قام كل من جون طومبسون John Thompson ورسلان عبدالله Ruslan Abdullah وادوارد كوكنج Edward Cocking من جامعة نوتنجهام بإنجلترا بتطوير نظم استزراع محسنة تمكن أيضاً من التعرف على الانقسام المقبول بواسطة جبلات خلايا نباتية فردانية، وباستخدام هذه النظم، أوضح الباحثون بما لا يدعو الشك التجديد الفعال لنباتات الأرز كلها من جبلات الخلايا النباتية بواسطة التكوين الجنينى الجسدي somatic embryogensis (شكل ١٠-٤).

وتستلزم الأساليب التقنية أن تستحث خلايا الأرز أولاً على النمو فى مزرعة معلقة لعدة شهور، وبعد ذلك،تنتج جبلات الخلايا النباتية وتنمو بنفسها فى المزرعة،ولكن هذه المرة فى أطباق المعمل، وتكون جبلات الخلايا النباتية المنقسمة مستعمرات تطور أجنة جسدية،ويمكن من هذه الأجنة تجديد النباتات كلها، ويحتمل تطبيق نظم مشابهة على نطاق واسع من أنواع الأرز،وفقاً لأبحاث كوكنج وزملائه.



شكل ١٠-٤ صف من نباتات الأرز التى تجددت من جبلات الخلايا،وتنمو فى صوبة زجاجية فى جامعة نوتنجهام.

واستزرع باحثون آخرون جبلات خلايا اللفت Brassica napus (زيت بذرة اللفت) فى نظام تنقيط مجهرى يستخدم وسطاً تخليقياً، وحصل الباحثون على معدلات بقاء لجبلية الخلية النباتية تزيد على ٧٠%،وتكرار انقسام يصل إلى ٦٥%، ويجب أن يزيد البحث من معرفة فسيولوجيا أنواع الخلايا المختلفة،وإذا كان من الممكن نشرها فى سلسلة من الأنواع الأخرى،فينبغى أن تحسن القدرة على استزراع منتجات دمج جبلة الخلية النباتية.

ينتمـــى الأرز والحبـــوب الأخـــرى إلـــى شـــعيبة النباتـــات وحيـــدات الفلقة[٩] monocotyledonois ،والتى سميت بهذا الاسم لأن لها فلقة واحدة، وثبـت أن تجديد النباتات وحيدة الفلقة من جبلات الخلايا النباتية أنه أكثر صعوبة بصفة عامة من تجديد النباتات من النباتات ثنائيات الفلقةdicotyledonous، فالبقوليـات على سبيل المثال، من ثنائيات الفلقة،وبالنسبة لهذه النباتات فقد حلت إلى حد كبير معظم مشاكل زراعة الخلايا والأنسجة ، باستثناء تلك المشاكل المصاحبة لتجديد النباتات من جبلات خلايا فول الصويا.

والبقوليات، مثل البرسيم الأبيض(Trifolium repens) والبرسـيم الحجـازى (Medicago sativa)،يمكن أن تسبب حالة قاتلة بصورة محتملة،تسـمى بنفخـة المجترات bloat للماشية وحيوانات المزرعة الأخرى التى تأكلها، وقـد يمكـن الحصول على سلالات من البرسيم الأبيض والحجازى خالية من نفخة المجترات بإدماج جبلات خلايا البرسيم الأبيض مع جبلات خلايا من نباتT.avense وهو نوع من البرسيم، تتراكم على أوراقه عفصيات مكثفة تعمل كعوامـل مضـادة لنفخة المجترات، والطريقة البديلة،أن تدمج جبلات خلايا البرسـيم الأبـيض أو البرسيم الحجازى مع جبلات خلايا السنفون (نبات قرنفلى الإزهار)، يحتوى على العفصيات فى أجزائه الخضراء،أو مـع جـبلات خلايـا مـن اللـوتس القرينى(نبات عشبى من الفصيلة القرنية)،الذى يعتبر علفاً بقلياً خالياً من نفخـة المجترات.

[٩]ـ وحيدات الفلقة:أحد قسمى كاسيات البزور،أما القسم الثانى فذوات الفلقتين،ومن فصائل وحيدات الفلقة النجيليـة والنخلية والزنبقية والقلقاسية والسحلبية والمزمارية،الخ. (مرجع سابق ذكره).المترجم

ومع ذلك ، فإن هناك حاجة إلى الطرق التى يسهل بها فصل الهجن من أمهات جبلات الخلايا فى المزرعة ،قبل أن يتحقق هذا التطبيق والتطبيقات الأخرى المحتملة لإدماج جبلة الخلية، ويمكن عزل الهجن،إذا كان يحمل كل شريك فى الإدماج طفراً انتخابياً مختلفاً، وفى هذه الحالة،فلن تحتوى على كلتا الطفرتين سوى الهجن ،وبذلك يمكن تمييزها عن النباتات الأم ، وبصفة عامة لا توجد الطفرات المناسبة لهذا الانتخاب المتكامل فى البقوليات والحبوب.

وعلى الرغم من أنه قد تم تجريب العزل الميكانيكى لجبلات الخلايا المدمجة، فإن الحصول على أعداد كافية لإجراء تقييم معقول ليس ممكناً عادة، ويحتمل أن يؤدى الإدخال الحديث لفرز الخلية المنشط الفلوروسنتى لفصل الهجن من جبلات الخلايا الأخرى إلى إحداث تغييرات جذرية فى المعدل الذى يساعد على إجراء تقييم لإنتاج الهجين بواسطة إدماج جبلة الخلية.

وبالمثل فقد تأخر تحسن الكرنب[١٠] Brassica ،بسبب نقص طرق انتخاب الهجين، وقد حلت معظم مشاكل زراعة الخلايا والأنسجة المصاحبة لتجديد النبات من جبلة خلايا اللفت،والتحدى الباقى هو تطوير طرق انتخاب ملائمة، وأحد أهداف إدماج جبلة الخلية مع الكرنب،هو إنتاج سلالة تحتوى على عوامل عقم ذكرى سيتوبلازمية،ويجب التعرف على الأصناف المناسبة لنقل تلك العوامل.

وعلى الرغم من أن جبلات الخلايا الهجين التى تكونت من دمج طفرات مختلفة قد تم عزلها بواسطة مجموعات وراثية كاملة ، فقد تتطلب طرق

[١٠] ـ الكرنب(**Brassica**):جنس الكرنب من الفصيلة الصليبية،يشمل اللفت والقنبيط إلخ...وهى بقول مشهورة.(معجم سابق ذكره).المترجم

الإختيار هذه تطوير طفرات جديدة أو علامات مبنية على استجابات نمو تفاضلية لكل مجموعة من الأنواع، وتتضمن الطريقة البديلة أن يضم في نوع واحد طفر زائد الاغتذاء ،يفرض مطلب غذائي جديد على النبات مع طفر سئ يعطي مقاومة لمضاد حيوي.

وقد أنتج مؤخراً كوكنج وبنتال وزملاؤهما في نوتنجهام هذا الطفر المزدوج للطباق(تبغ معروف أو شائع)[11] Nicotiana tabacum،عن طريق تهجين نباتات الطباق المقاومة للإستربتوميسين مع نباتات الطباق التي بها طافر يجعلها ناقصة في إنزيم نترات ردكتاز، ولا تستطيع النباتات التي ينقصها هذا الإنزيم أن تستمر في النمو مع النترات(ملح حامض النتريك)،كمصدر وحيد لها من النتروجين،ولكن يجب تزويدها بالأمونيا أو بعض المصادر البديلة الأخرى من العنصر الأساسي.

وأنتج باحثو نوتنجهام نباتات الطباق هذه ذات الطافر المزودج عن طريق كل من طرق التربية الجنسية القياسية، وعن طريق إدماج جبلات خلايا ملائمة. وشفرت المقاومة للإستربتوميسين في مجموعة العوامل الوراثية لجبيلة اليخضور،حيث يقع جين نترات ردكتاز على كروموسوم داخل النواة، وتم إدماج جبلة الخلية بطريقة بحيث تنتج الهجن التي جاء السيتوبلازم المحتوى على الجبيلات اليخضورية من نبات ذي مقاومة للإستبرتوميسين،وجاءت النوى(جمع نواة) من النبات الذي يوجد به جين نترات ردكتاز الطافر، ويمكن

[11] تبغ معروف أو شائع(منه صنف التبغ البلدي في اللاذقية وبعض الأصناف الأمريكية.وشك البنت وأبو ريحة والتنباك البلدي في اللاذقية كلها صنف واحد تتبدل أشكاله على حسب طريقة زراعته والغاية المتوخاة منه.)،معجم سابق ذكره.المترجم.

تمييز الهجن الناتجة،لأنها مقاومة للمضاد الحيــوى الإستربتوميســين،وتتطلب مصدر نتروجين غير نتراتى.

ويمكن استخدام جبلات خلايا الطباق ذات الطافر المزودج فــى التهجــين[١٢] الجسدى مع جبلات خلايا سلسلة أخرى من الأصناف النباتية، ويمكن الحصول على الهجن crosses التى ستكون صعبة أو مستحيلة أو يتم الحصـــول عليهــا بواسطة طرق التربية التقليدية، وعلى سبيل المثال،عندما تستخدم جبلات خلايا البطونية[١٣](Petunia hybrida) كمشارك فى الإدماج،فيمكن أن تنتج الهجن التــى يكون بها مجموعة عوامل وراثية نووية لـــPetunia hybrida ومجموعة عوامل وراثية لجبلة يخضور الـــN.tabacum ، ويمكن تمييز الهجــن لإنهــا تقــاوم الإستربتوميسين وقد استعادت القدرة على النمو على النترات كنتيجـــة لتزويــد مركب البطونية بإنزيم نترات رادكاتز.

وعند محاولة إنتاج نباتات هجين بواسطة إدماج جبلة الخلية،فمن الأفضل لو أمكن تجديد النباتات من جبلات خلايا من كلا الأبوين(الأصليين)، ومع ذلك،فقد أوضحت الدراسات الأولية على البطونية أن تجديد نبات الهجين،يعتبــر ممكنــاً حتى لوكان أحد المشاركين فقط فى الإدماج يكون قادراً على تجديد النباتات كلها من جبلات الخلايا.

[١٢] ــالتهجين:هو حصول لقاح بين نباتين من نوعين مختلفين.ونتيجة اللقاح تسمى النغــل والبغــل.لكــن الكلمــة الإنجليزية كثيرا ما تستعمل فى النبات بمعنى التهجين**crossing** وهو القاح نبات من نوع معلــوم بنبــات مــن النوع نفسه ولكن من صنف آخر، كإلقاح الحنطة الحورانية بالحنطة البيرودية مثلاً،وفى هذه الحال يســمى هــذا العمل فى علم النبات تهجيناً،وتسمى نتيجته هجيناً.(معجم سابق ذكره).المترجم

[١٣] ــ بطونية.تبغية:سميت تبغية لصلاتها النباتية بالتبغ،والاسم العلمى من البرازيلية،جنس أزهــار مبذولــة مــن الفصيلة الباذنجية تسمى بطونية،وهى تعريب الاسم العلمى(.معجم سابق).المترجم.

بالإضافة إلى ذلك،فقد اتضح فى الآونة الأخيرة إن الإدماج بين جبلات خلايا الطماطم المنزرعة،التى لا تستطيع أن تجدد النبات كله، وجبلات خلايا نوع طماطم برى تكون قادرة على تجديد النبات،يمكن أن ينتج عنه إنتاج نباتات هجين جسدية ذات إخصاب ذاتى، وهذا يعنى أن إنتاج الهجين عن طريق إدماج جبلة الخلية،قد يكون أقل اعتماداً على قدرة النبات على التجديد عما كان يعتقد من قبل.

إنتاج الأيضة فى المزرعة
Metabolite production in culture

من السمات الخاصة لبذور النباتات،تخليق منتجات أيضية ذات تنوع كبير، يشمل التربينينات terpenoids، والستيرويدات steroids، والقلويدات alkaloids، والزيوت الأساسية، والصبغات pigments (جدول ١٠-١)، ويمكن استخدام مزرعة الخلية النباتية فى توضيح المسارات الكمياحيوية المطلوبة لتخليق، وتكديس، وهدم هذه المنتجات الأيضية،وفى بعض الحالات من أجل إنتاجها الكيميائى التجارى .

وحتى وقت قريب،كان البحث الرئيس يؤكد على عزل سلاسل من الخلايا ذات قدرة على تكديس منتج يتوافق مع قدرة النبات الأصلى، وقد اعتمدت التحسينات على القدرة على استزراع الخلايا باستخدام إما زراعة كتلة الخلية أو بشل حركة الخلايا كلها.

جدول ١٠-١ منتجات طبيعية من النباتات والصناعات المصاحبة لها

الصناعة	المنتج النباتى	نوع النبات	الاستخدامات الصناعية
الدوانيـــــات	كودبين(قلوانى ديوزجنين(ستروبد) كينين(قلويد) ديجوزين(جلوكوسيد ناعش للقلب) سكوبولامين(قلوانى نباتى) فينكرستين(قلوانى)	خشخاش منوم ديزوكوريا دلتويدا كينكونا لديجريانا دجيتالس لانات عشب استرامونيوم كاثارانثيس روزيس	مسكن عوامل مضادة للخصوبة مضاد للملاريا مقوى للقلب مضاد التوتر الزائد مضاد لسرطان الدم
كيماويـــــات زراعيـــــة	بيراثرين	أقحوان	مبيد حشرى
أغذيـــــــة ومشروبـــات	كينيا(قلوانى) ثيوماتين(خالقونى)	كينكونا لديجريانا ثوماتوكوكس دانيللى	عامل مسبب للمرارة محلى غير غذائى
مستحضـــرات تجميـــــــل	شيكونين	ليثوسبرم ايرثروهيون	صبغة

ويمكن توضيح تطبيقات التكنولوجيا الحيوية فى طرق زراعة الخلية النباتية للأغراض التخليقية،من خلال وصف إنتاج صبغ الشيكونين الأحمر،الذى يعد المصدر النشط من الجذر الأرجوانى لنبات Lithospermum erythorhizon، وهو عشب دائم موطنه اليابان وكوريا والصين، ويمكن استخدام الشيكونين فى الأصباغ والمراهم ومستحضرات التجميل، وقد أنتج اللون الأحمر فى العلم اليابانى طيلة سنوات عديدة باستخدام صبغة الشيكونين.

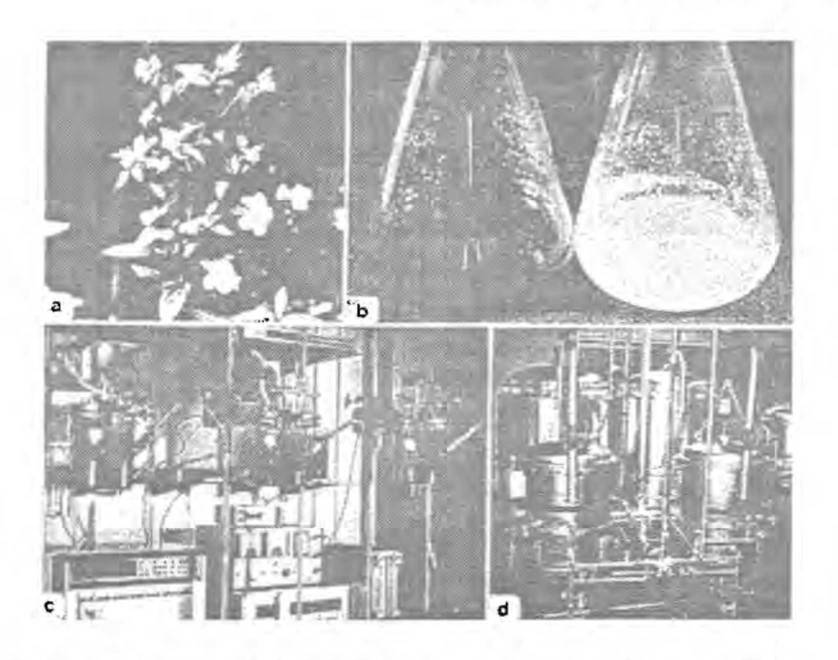
وهناك سلسلة أبحاث رائعة قام بها مامورو تاباتا Mamoru Tabata وياسوهيروفيوجيتا فى جامعة طوكيو باليابان، توصلت إلى إنتاج الشيكونين بطريقة صناعية ناجحة بواسطة طرق زراعة الخلية(شكل١٠-٥)، وأبرز أهمية

إقران الدراسات الأساسية على إحداث الكالوس، وانتخـــاب الخليـــة والتخليـــق الحيوى للمنتج وتمركزه، بالدراسات التطبيقية على تحسين وسط الإنتاج.

وأوضحت الدراسات الأساسية لتباتا وفيوجيتا علـــى الانتخـــاب ،أن خلايـــ القُلْبLithospermum(وهو جنس من الفصيلة الحِمحِمية) المستزرعة تختلف فى قدراتها التخليقية للشيكونين،وأنه يمكن زيادة محتوى صبغ الخلايا بدرجة كبيرة بانتخاب خلايا عالية الإنتاج ، ولما كانت معرفة العوامل المنظمة للأيض على درجة من الأهمية مثل انتخاب الخلايا عالية الإنتاج،فقد اختبر الباحثون بطريقة تنظيمية تأثيرات درجة الحرارة وطول موجة الضوء وهرمونات النمو ومصادر الكربون والنتروجين على إنتاج الشيكونين، وقد أوضحوا أنه يمكن إحداث تخليق للصبغة فى مزارع الخلايا المعلقة،عن طريق إضافة مســحوق الآجــار(مــادة غروية تستعمل لتجميد المستنبتات) لوسط المزرعة، إلا أن مادة الآجار مكلفــة نسبياً،وكان من المفضل من الناحية الاقتصادية استنباط وســط إنتــاج،يمكن أن ينتج فيه خلايا الشيكونين فى غياب الآجار.

وقد وجد تاباتا وفيوجيتا أن خلايا الـــــــLithospermum ســتنتج أصــباغ الشيكونين بصورة دقيقة فى وسط يحتوى على نترات،كمصدر نتروجينى غيــر عضوى وحيد، على الرغم من أن نمو الخلية كان إلى حد ما ضعيفاً، ومن خلال التقييم النظامى لكل مكونات هذا الوسط،وجد الباحثون أن زيادة ثلاثين ضعفاً من تركيز الكالسيوم،تسبب زيادة ثلاث أضعاف فى إنتاجية مشتقات الشيكونين،ولكن

بدون تحسين نمو الخلية، وقد استطاعوا فى النهاية حل مشاكل نمو الخلية عن طريق استنباط نظام مزرعى ذى مرحلتين ، ففى المرحلة الأولى تنمو الخلايا فى وجود الآجار،وبعد ذلك تنقل إلى وسط خال من الآجار ذى نسبة كالسيوم عالية لزيادة الحصيلة النهائية من المنتج.



شكل ١٠-٥ فى هذا الشكل المركب، (a) يبين نبات الشيكونين فى مرحلة إزهار، وفى (b) قوارير خلايا مستزرعة من النبات قبل وبعد حثها على إنتاج صبغة الشيكونين الحمراء، (c) توضح مزراع إنتاج خلايا الصبغة فى المعمل، وفى (d) الأوعية الكبيرة للإنتاج التجارى للصبغة.

واستنتج تباتا وفيوجيتا أن نظام زراعة الخلية لإنتاج الشيكونين يعتبر أكبر بحوالى ٨٠٠ مرة عن إنتاجه من طريقة زراعة النبات التقليدية، حيث أن محتوى الصبغة فى الخلايا المستزرعة أعلى ١٥ مرة من محتواها فى المادة النباتية. وعلاوة على ذلك،فإن طريقة زراعة الخلية تستغرق أقل من شهر حتى تكتمل بالمقارنة بـ ٤٨ شهراً لزراعة النبات بالطريقة التقليدية.

وعلى الرغم من أنه قد تم تخليق الشيكونين مؤخراً من مادة ديهيدروكسى نفتالين،فقد كان لا يزيد المنتج النهائى عن ٠,٧% ، وفى الوقت الحاضر،يعتبر إنتاج الصبغة بواسطة زراعة الخلية النباتية أكثر اقتصاداً من إنتاجه بالتخليق الكيميائى، وقد استخدم الشيكونين المنتج بكميات كبيرة فى المزرعة من خلايا نبات القلبLithospermum بشكل تجارى فى إنتاج مستحضرات التجميل منذ عام ١٩٨٤.

وتقييم المدى الذى طورت فيه نوعية الطريقة بصورة ناجحة لتخليق الشيكونين،سيكون من الصعب تطبيقه على نظم أخرى، وعلى سبيل المثال، عند التحفيز على تكوين منتج من خلال تغيير ظروف الاستزراع بينما كان ناجحاً بدرجة كبيرة لإنتاج القلويد من خلال مزرعات نبات Catharanthus roseus(العناقية الوردية)، كان غير مثمر إلى حد كبير مع زراعات الخشخاش١٤التى أظهرت قدرة محدودة على تكديس المورفين القلويد، ومع ذلك،فإن هذا لا يمكن إلا أن يعنى أن ظروف الاستزراع الصحيحة للإنتاج العالى من المورفين لم تكتشف بعد، ومما يجدر بالملاحظة فى هذا الخصوص،أن شدة درجة الحرارة تحدث تغيراً فى الكميات النسبية للقلويدات المختلفة الناتجة من الخلايا المستزرعة من أنواع الخشخاش العديدة.

[14]ــ الخشخاش:جنس نباتات عشبية من الفصيلة الخشخاشية،فيه أنواع برية،وأخرى تزرع لزهرها،وفيه النوع المعروف الذى يستخرج منه الأفيون(.معجم سابق ذكره).المترجم

تحــول النبــات بواسطــة الـــ د.ن.أ المطعــم
Plant transformation with recombinant DNA

توفر حاليا تكنولوجيات زراعة الخلية والأنسجة النباتية التى ناقشناها حتــى الآن فرصاً للحصول على أنواع جديدة من المحاصيل النباتية المحسنة للأسواق، وعلى الرغم من ذلك،،فهناك اهتمام كبير بتطبيق طرق الاستزراع التى تتضمن إدخال د.ن.أ غريب، يتم الحصول عليه من تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم إلى خلايا النبات المستزرعة لجعلها تتحول وراثياً، على الرغم من أنه قد تمضــى سنوات عديدة قبل الحصول على منتجات مهمة من الناحيــة التجاريــة بهــذه الطريقة.

وقد أشار بنتال وكوكنج إلى أن التهجين الجسدى عن طريق إدمــاج جبلــة الخلية والتحول الوراثى،يعتبران طريقتين مختلفتين اختلافاً جذرياً عن استغلال مجموعة العوامل الوراثية النباتية، وفى التهجين الجسدى،كما هو الحــال فــى التهجين الجنسى،يدرك الباحــث أن الشــبه الظــاهرى[١٥]phenotype(الصــفة الملحوظة) ينتمى إلى البنية الوراثية[١٦] genotype (تكوين وراثى معين)،غير أن الاعتماد يكون على انتخاب شبه ظاهرى ثابت ومرغوب، وفى المقابل يكــون الاستغلال الوراثى الناجح بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم معتمداً علــى العلاقة ما بين الشبه الظاهرى والبنية الوراثية،لكى يتحقــق مــن أى النشــاط الكيميائى الحيوى أو التطورى يتحكم فيه أو يعدلــه تسلســل د.ن.أ محــدد ، وسوف يعتمد نجاح هذه الطريقة على مدى إمكانية التعــرف علــى الجينــات

١٥ــ شبه ظاهرى: صفة مماثلة بين العضوين بغض النظر عن الأصــل الجينــى للصــفة – أى أن الكــائنين المتماثلين فى هذه الصفة قد لا يتناسلان بشكل متطابق فى تلك الصفة.

[١٦]ــالبنية الوراثية: التكوين الوراثى للفرد أو الجنس الذى يمثله.

المشفرة عن صفات معينة،وعزلها عن مجموعة عوامل وراثية لنبات أو نوع آخر واستنساخها، وهذه التسلسلات يمكن حيئذ نقلها إلى النباتات التى سيتم استغلالها وراثيًا، ويتركز اهتمام كبير فى الوقت الحالى على السهولة التى يمكن بها تحقيق هذا المطلب،واستخدام الخلية النباتية وزراعة الأنسجة فى هذا الخصوص.

وقد جعلت تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم من الممكن عزل كميات كبيرة من الجينات النقية التى قد يمكن استخدامها فى إنتاج محاصيل أفضل ، ومع ذلك،فقد أشار جون بنجهام من معهد تربية النبات فى كمبردج بانجلترا إلى أنه يمكن إجراء تحسين للعديد من النباتات بواسطة الطرق التقليدية الجارى استخدامها حالياً،التى لا تعتمد على الطرق المنهجية لزراعة الخلية والأنسجة ولا على أساليب الـ د.ن.أ المطعم، وعلى الرغم من أن الأهداف تحتاج إلى تقييم بطريقة دقيقة،إلا أن الإسهامات الكبيرة يحتمل أن تأتى من الجمع ما بين أساليب الـ د.ن.أ المطعم ونظم زراعة الخلايا والأنسجة مع طرق تربية النبات التقليدية.

وهناك فئتان من الأنظمة يستخدمان فى نقل د.ن.أ غريب إلى مجموعة العوامل الوراثية للنباتات الراقية، يتضمن أحدهما على استخدام بكتيريا من جنس البكتير الزراعيAgrobacter كمتجهات لنقل الجينات، وجاء تطور هذا النظام من إثبات أن جزء من بلازميدTi(وهو البلازميد المحدث للورم) من الكائن العضوى،أصبح مندمجاً فى مجموعة العوامل الوراثية لخلية النبات المصابة، وعلى ذلك يمكن للجين الغريب الذى أدخل فى موقع معين داخل بلازميدTi،أن يدخل فى مجموعة العوامل الوراثية للنبات(انظر أيضا الفصل الحادى عشر)، بالإضافة إلى ذلك،فإنه يمكن امتصاص الـ د.ن.أ لبلازميدات البكتير الزراعى المعزولة مباشرة بواسطة جبلات الخلايا النباتية فى المزرعة.

ومن أحد الأمور الجذابة للتحول بواسطة البكتير الزراعى،هو أن هذا الإجراء يعتبر إجراءً مباشراً تماماً فى العديد من أنواع النبات، ويجرى تحضين أقراص الأوراق مع البكتيريا لعدة ساعات، وتتكون البراعم من خلايا الأقراص المتحولة بعد أن تنمو لعدة أسابيع قليلة فى وسط مزرعى مناسب، ويمكن الحصول على نباتات متحولة من الطباق والبتونيا فى غضون أشهر قليلة من إصابتها بالبكتيريا، وتنجح هذه الطريقة البسيطة لنقل الجينات إلى النباتات بصورة جيدة مع الأنواع التى أصيبت ببكتيريا من نوع البكتيريا الزراعية،ويمكن أن تتجدد بسهولة فى النباتات بواسطة أقراص الأوراق، وتشمل هذه الأنواع على الطماطم والطباق والعديد من البقوليات الورقية. ويحفز النجاح فى هذه الأنواع على توسيع محاولات هذا الأسلوب إلى محاصيل أخرى، مثل أنواع الكرنب والبقول الحبوبية، بيد أن النباتات الحبوبية تعتبر من وحيدات الفلقة، التى تكون أقل خضوعاً من ثنائيات الفلقة للإصابة بالبكتير الزراعى.

ولما كان احتمال تجديد البراعم يحدث أساساً من خلايا ورقة واحدة فى تلك الأنواع التى لا تكون كالوس أثناء التجديد،فإن الإجراء البسيط للإصابة بالبكتير الزراعى،قد حل بدرجة كبيرة محل طريقة نقل جبلات الخلايا من خلال استزراعها مع البكتيريا، ومع ذلك،تعتبر طريقة الاستزراع المشترك هذه جذابة جداً لنقل الجين،خصوصاً إذا توفر النظام المنتج لتجديد النبات من جبلات الخلايا. وهذه هى الحالة المنطبقة على الطباق،وعندما استزرعت جبلات خلايا عمرها ١٤ يوما من هذا النوع استزراعاً مشتركاً مع خلايا البكتير الزراعى،فقد انتقل من واحد إلى ثلاثة بالمائة منها بواسطة بلازميد Ti الـــــــ د.ن.أ.

ويظهر الاختلاف بين معدل التكرارية العالية للتحول فى تجارب الاستزراع المشترك،وأيضاً فى تجارب تحضين القرص الورقى مع معدل التكرارية المنخفضة للتحول ،الذى يكون عادة ٠,٠٠٠١% والذى يتم الحصول عليه عادة من تحضين بلازميدات الـ Ti المعزولة مع جبلات خلايا الطباق أو البتونيا ، وفى الآونة الأخيرة، اشتملت سلسلة الأساليب التى تحفز على امتصاص الـ د.ن.أ، على المعالجة بصدمة حرارية، وبوليثيلين جليكول، وتيار كهربى،قد زادت بدرجة كبيرة من معدل تكرارية تحول جبلة خلية الطباق مع د.ن.أ غريب،إلى أن أصبحت الآن تماثل أو أفضل من المعدل الذى يتم الحصول عليه من الاستزراع المشترك مع البكتير الزراعى.

وكما يكون متوقعاً من غياب جدار خلية فى جبلات الخلايا، فيبدو أنه لا يوجد حتى الآن نوع عائق لطرق الامتصاص المباشرة، فحتى حشائش وحبوب، مثل النبات العشبى Lolium multiflorium ، والحنطة وحيدة الحبة Triticum monococcum، والذرة ، والأرز، وقصب السكر،وهى جميعها من وحيدات الفلقة،ولا تصاب بسهولة من البكتير الزراعى، تخضع لنقل الجين المباشر إلى جبلات الخلايا.

ونتيجة لذلك، يعمل النقل المباشر للجين على تفادى القيود المفروضة على استخدام بكتيريا البكتير الزراعى كلها، والمشكلة الرئيسة الباقية التى تحد من نقل الجين إلى الحبوب،هى عدم القدرة على تجديد النباتات بكاملها من جبلات الخلايا، ومع ذلك، كما أوضحنا من قبل،فإن التجديد الممكن احداثه للنباتات من جبلات خلايا الأرز،قد أصبح الآن واضحاً بصورة مطلقة، ويبدو أنه من المحتمل، شريطة أن ينصب الاهتمام على إيجاد ظروف الاستزراع الصحيحة

بواسطة طرق مماثلة،أن تحل المشاكل الحالية بالنسبة للحبوب الأخرى والأنواع الأخرى التى تبدى مقاومة حالياً لتجديد جبلة الخلية.

ومن الواضح بوجه عام أنه يجرى تطوير طرق لتحول النباتات بواسطة د.ن.أ غريب. والتحدى القائم، هو استخدام الطرق فى نقل الصفات المهمة من الناحية الزراعية إلى النباتات، ولا يوجد سوى عدد قليل من هذه الصفات،تشمل على المقاومة لبعض مبيدات الأعشاب،تعتبر تحت سيطرة جين أو جينات قليلة تم تحديدها. ويحتمل أن يكون التقدم بطيئاً فى معظم الحالات،حيث يتحكم فى العديد من الصفات التى يرغب الزراعيون فى تحسينها جينات عديدة، وعلاوة على ذلك،فلم يتم تحديد الجينات فى معظم الحالات،بالإضافة إلى أنه لا يعرف أيضاً العوامل التى تتحكم فى تعبيرها فى مراحل معينة من تطور النبات.

وتنطبق اعتبارات مماثلة على خلايا النباتات المستزرعة لإنتاج المركبات شبه القلوية والعقاقير المهمة الأخرى، ومع ذلك، فعلى الأقل بالنسبة لهذه التطبيقات لم يعبأ الباحثون بتجديد النباتات كلها من جبلات الخلايا المنقولة.

توقعات الخلية النباتية وزراعة الأنسجة فى التكنولوجيا الحيوية

The outlook for plant cell and tissue culture in biotechnology

سوف تستمر طرق زراعة الأنسجة والخلايا النباتية ليكون لها التأثير القوى فى التكنولوجيا الحيوية،ربما يكون أكثر على المدى الطويل من زراعة الخليـة الحيوانية،بسبب القدرة على تجديد الوظائف النباتية كلها من الخلايا المستزرعة، وعلى الرغم من أن هذا الفصل قد أوضح الاستخدامات العديدة لزراعة الأنسجة والخلايا النباتية لنشوء التغير ولإنتاج الهجين بواسطة إدمـاج جبلـة الخليـة. ولإنتاج الأيضة، وللتحول بواسطة الــ د.ن.أ المطعم،فإن جميع هذه التطبيقات ترتبط ببعضها ارتباطا جوهرياً.

وعلى سبيل المثال، فقد يعزز تحول الخلايا النباتية بواسطة الجينات الغريبة إفراز منتجاً أيضياً،ويسهل بالتالى عملية استخلاص المنتج، أو،التحول بواسـطة جينات منA.rhizogenes ،التى لها علاقة بـA.tumefaciens،الذى يحدث التكاثر الجذرى الشاذ المعروف بـمرض الشعيرة الجذرية،قد يسهّل انبثاق الجـذور من النباتات التى تجددت من الخلايا المستزرعة، وغالباً ما يكون انبثاق الجذور عنق الزجاجة لتجديد النبات، وعلاوة على ذلك،فقد تكون الشعيرات الجذرية هى نفسها نظاما متحولاً ، يعجل من خلاله تخليق منتج.

وأخيراً،فقد يمكن استخدام إدماج جبلات الخلايا النباتية أيضاً فى إنتاج خلايا هجين،يزداد فيها تخليق منتج أيضى، وفى التكنولوجيا الحيوية،تعتبر الطريقـة التى يصنع بها المنتج هدفاً ثانويا، وما يعول عليه هو أن تنتج بطريقة اقتصادية وبسعر منافس لأى تكنولوجيا بديلة.

الفصل الحادى عشر

تحسين المحاصيل النباتية عن طريق إدخال جينات معزولة

Improving crop plants by the introduction of isolated genes

يهدف مربى النبات إلى تحسين المحاصيل النباتية الزراعية عن طريق تغيير خصائصها الوراثية، ويتحقق هذا الهدف عادة من خلال جمع صفات وراثية لنباتات مختلفة، لكنها ترتبط فيما بينها بصلة،إما من خلال التزاوج الجنسى أو من خلال الأسلوب الأكثر تطوراً، وهو دمج الخلية الجسدية somatic cell fusion(انظر الفصل العاشر). بالإضافة إلى ذلك،يمكن إحداث طفرات وراثية فى النباتات بمعالجتها بمواد كيميائية أو بإشعاع،ولذا فسوف تكون نسبة مئوية قليلة من الطفرات الناتجة من هذه الطريقة مفيدة.

ويعد نجاح طرق تربية النبات التقليدية واضحاً،فقد كانت المساهم الرئيس فى الثورة الخضراء خلال فترة الخمسينات والستينات،والتى أدت فى النهاية إلى زيادة إنتاجية محاصيل الحبوب الرئيسة مرتين أو ثلاث مرات، وعلى الرغم من ذلك ، فللطرق التقليدية بضع قيود، القيد الأول،لا يمكن إجراء تحسين وراثى معين إلا إذا كانت الصفة التى يرغب المربى فى إدخالها فى النبات المستهدف تنقل بواسطة أنواع متوافقة جنسياً،والذى يعنى أن النباتين يجب أن يكونا مرتبطين بصلة قوية .

القيد الثانى،تحتاج عمليات التهجين والهجين الرجعى backcrosses ،التى يجب القيام بها لاختيار أفضل مجموعة ممكنة من الخصائص الوراثية إلى فترة

زمنية طويلة ، وكما هو معهود فإنها تصل ما بين ١٠-١٥ سنة، والسبب في ذلك هو أن التزاوج الجنسي يضم مجموعتي العوامل الوراثية من كلا الأبوين،وتكون النتيجة أن يصبح هناك عدد كبير جداً من التركيبات الوراثية ممكناً، ولا ينجح إلا القليل من هذه التركيبات الوراثية ،ويحتاج إيجاد المجموعات المرغوبة إلى وقت كبير، وجهد، ومهارة وقدر من الفطانة والحظ.

وقد أدت القدرة على عزل الجينات واستنساخها،المقترنة بتطور الأساليب المعتمد عليها لإدخال جينات إلى النباتات، إلى فتح طريق جديد أمام التحسين الوراثى للنباتات،التى يمكنها التغلب على القيود الموجودة فى طرق التربية التقليدية، وتتكون استراتيجية الجديدة من البحث عن أى كائن عضوى ، سواء أكان نبات ،أو بكتيريا، أو فطر، أو حتى حيوان ، يحمل الصفة التى يرغب الباحث فى أن يدخلها إلى النبات المستهدف ،وبعد ذلك يستخدم أساليب الـ د.ن.أ المطعم لعزل الجين الذى يتحكم فى هذه الصفة، بعد ذلك "يعاد برمجة" الجين المعزول،بحيث يمكنه أن يعبر داخل الخلايا النباتية،ويدخل محصول نباتى عن طريق متجه نقل الجين.

وبمجرد أن يتم عزل جين مفيد،فإنه يمكن نقله من حيث المبدأ إلى العديد من المحاصيل المختلفة،دون حاجة إلى برنامج تربية مطول، والقيد الرئيس فى طرق نقل الجين، فى الوقت الراهن على الأقل ، أنها لا يمكن أن تستخدم إلا لصفات يتحكم فيها جين واحد أو عدد قليل من الجينات، هذه الصفات المفيدة،مثل صفة مقاومة مبيدات الأعشاب والأمراض تنتمى إلى هذه الفئة،وقد أوضح الباحثون بالفعل أن الصفات الجديدة للنباتات المقاومة للمبيد العشبى أو الأمراض،يمكن أن تنتج بطرق نقل الجين، وعلى الرغم من ذلك ،فلا يمكن أن

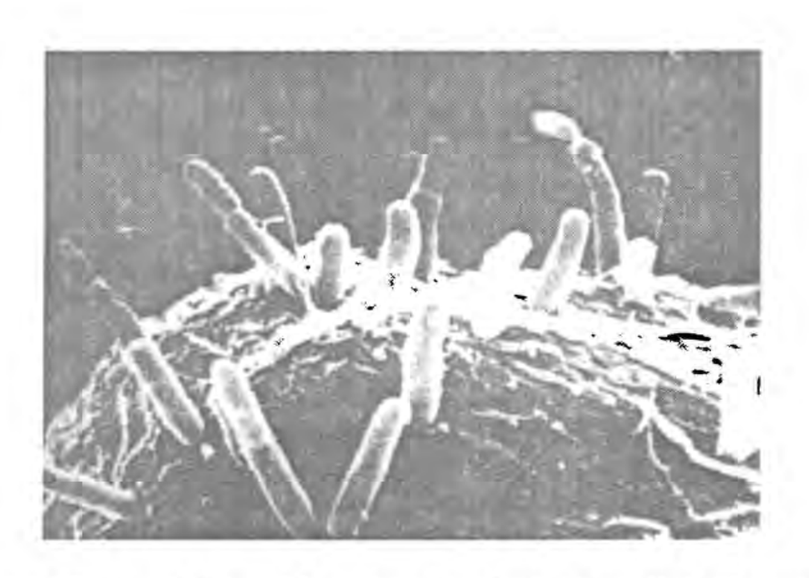
تحل أساليب نقل الجين محل برامج التربية التقليدية؛ فطرق النقل هى أداة بديلة وقوية أخرى لمربى النبات.

تطوير متجهات نقل الجين للنباتات

The development of gene transfer vectors for plants

استخدام طرق نقل خواص الجين نفسه

ظل علماء أمراض النبات مهتمين لفترة طويلـــة ببكتيريـــا التربـــة،بكتيريا الأورام الزراعيةAgrobacterium tumefaciens(شكل ١١ــ١) بسبب الأمـــراض النباتية التى يحدثها ، ويمكن أن تصيب سلالات عديدة من هذا الكائن العضوى معظـــم أفـــراد إحـــدى شـــعيبتين رئيســـتين مـــن النباتـــات،وهى ثنائيـــة الفلقةdicotyledonous والتى سميت بذلك لأن للأجنة ورقتين بذريتين، وتعتبـــر معظم الأشجار والشجيرات من ثنائيات الفلقة،وكذلك أنـــواع محاصـــيل نباتيـــة معروفة،مثل البطاطس وفول الصويا والطماطم والطباق، ويمكـــن أن تصـــيب بكتيريا الأورام الزراعية أيضاً بعض أفراد شعيبة النباتات الرئيسة الثانية،وحيدة الفلقةmonocotyledons، والتى لها ورقة بذرية واحدة، وتشـــمل هـــذه الطائفـــة الحشائش ومحاصيل الحبوب الرئيسة، كالأرز والقمح والذرة.



شكل ١١-١ . بكتيريا الأورام الزراعية. تظهر فى هذه الصـورة المصـغرة الممسـوحة إلكترونيا،بكتيريـا الأورام الزراعية قضيبية الشكل ،متصلة بقلنسوات خلايا جذور البازلاء

وكنتيجة لإصابة بكتيريا الأورام الزراعية ثنائيـات الفلقـة، فـإن النسـيج المجروح يتكاثر مثل نمو سـرطانى،يعرف باسـم التـدرن التـاجى[١] crown gall(شكل ١١ــ٢)، وهناك خاصيتان رئيستان تميزان التدرن التاجى وهما: قدرة الخلايا على النمو فى مزرعة دون الحاجة إلى إضافة الهرمونات التى يتطلبها نمو خلايا النباتات الطبيعية،وتخلق خلايا التدرن التاجى مجموعة جديـدة مـن المركبات،تسمى أوبينات opines،والتـى لا توجـد فـى الخلايـا الطبيعيـة، والأوبينات، هى مشتقات الأحماض الأمينية أو السكر التى تستخدمها البكتيريـا كمصادر كربون ونتروجين ، لكى تحث على تكون الورم.

[١] ــ تدرن تاجى:عفص إكليلى(مرض بكتيرى يحدث تدرنات شاذة فى أشجار الفاكهة وسـواها سـببه جرثومـة تعرف بالاسم العلمي**Agrobabterium tumefaciens**).معجم المصطلحات الزراعية للشهابى.(المترجم).

ولقد جذبت بكتيريا الأورام الزراعية اهتمام علماء البيولوجيا الجزيئية لأول مرة،عندما اكتشفوا أن بلازميـداً كبيراً،بلازميـدTi(أى البلازميـد المسـبب للورم)،هو المسبب للقدرات السرطانية للبكتيريا، وتكون الـورم هـو النتيجـة المباشرة لنقل د.ن.أ بلازميدTi من الخلايا البكتيريـة إلـى الخلايـا النباتيـة المصابة،حيث يندمج د.ن.أ البلازميد داخل مجموعة العوامل الوراثية النوويـة، وخلية البكتيريا الزراعية هى فى الواقع عبارة عن نسخة مصـغرة جـداً مـن مهندس وراثى، يمكنها أن تحدث إدخال ثابت لجينات غريبـة إلـى مجموعـة العوامل الوراثية لخلية النبات، ولا تسبب البكتيريا أوراماً لنباتات الحبـوب،غير أن هناك دلالة غير مباشرة،بأنها يمكن أن تدخل الـ د.ن.أ إلى بعض أنسـجة الحبوب الجنينية.

وقد استغل علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية حالياً هـذه القـدرة وحـوروا البلازميد المسبب للأورام كمتجه للقيام بالهدف بعيد التصور لإدخـال جينـات وظيفية جديدة إلى النباتات، غير أنه قبل أن يمكن تطوير البلازميـد المسـبب للأورام كمتجه ناجح ، كان على الباحثين أن يتعلموا قدرا كبيراً عن البيولوجيـا الجزيئية الأساسية للبلازميد وعن تعبير الجين النباتى.



شكل ١١-٢ . ورم أحدثه بكتير الأورام الزراعية فى نبات الطباق ، وخلال الإصابة يدخل البكتيـر إلـى خلايا النبات د.ن.أ من البلازميد المسبب للأورام ، ويحتوى الـ د.ن.أ المنقول على جينات تحـدث نمـوا شاذ ا لخلية النبات وتكون الورم ، وفى هذه الحالة، يعطى إنتاجية عالية من هرمون النمو النباتى، ولـذلك يسبب بروز أغصان خضراء من الورم.

وقد حور علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية نظام بكتيريا الأورام الزراعية لكى يستخدم فى الهندسة الوراثية للنباتات المحصولية،عن طريق إزالة الجينات التى تسبب تكون الورم من البلازميد المسبب للأورام ، والجينات المشفرة عن أحد الصفات المرغوبة مثل، مقاومة الأمراض أو الأعشاب، يتم إدخالها بدلاً عن ذلك فى البلازميد لكى تنتقل إلى نوع النبات المستهدف.

وتتضمن الإصابة بالبكتيريا الزراعية على الأقـل مرحلتين،الأولى،يمهـد تفاعل البكتيريا مع خلايا النبات لسلسلة من الأحداث تؤدى فى النهاية لأن تنتقل

إلى الخلايا النباتية قطعة معينة من البلازميد المسبب للأورام تسمى T-DNA (الـ د.ن.أ المنقول)، وفى المرحلة الثانية ،يندمج الـ د.ن.أ المنقول بصورة ثابتة فى مجموعة العوامل الوراثية النووية للخلايا النباتية.

وضمت المجموعات التى ساهمت فى فهم البيولوجيا الجزيئية للبلازميد المسبب للأورام، واستنباط المتجهات كل من مارى دل شيلتون Mary-dell Chilton من جامعة واشنطن فى سانت لويس،والتى أصبحت منذ فترة قريبة فى شركة سيبا جايجى فى نورث كارولينا، وروبرت فرالي Robert Fraley، وروبرت هورش Robert Horsch، وستيفن روجرز Stephen Rogers الذين يعملون بشركة مونسانتو فى سانت لويس، ومورتون جوردون Milton Gordon وأيوجين نستر Eugene Nester من جامعة واشنطن فى سيتل، وجوزيف شل Jozef Schell ومارك فان مونتيجو Marc Van Montagu وباتى زمبريسكي Patty Zambryski من جامعة جيهن الحكومية فى بلجيكا،ومعهد ماكس بلانك لتربية النباتات فى كولون بألمانيا الغربية، وروبرت شيلبروت Robert Schilperoot من جامعة ليدن فى هولندا، وجاكى تيمبي Jacques Tempe من معهد الأبحاث الزراعية فى فرساى بفرنسا، وآلين كر Allen Kerr من جامعة أدلايد بإستراليا.

ولكى ينقل الـ T-DNA ، يجب أن تحتوى البكتيريا الزراعية على جينات"خبيثة" virulence ،تمكن الخلايا البكتيرية من التعرف والتفاعل،ثم تدخل الـ T-DNA إلى الخلايا النباتية، وبالرغم من وقوع الجينات الخبيثة على البلازميد المسبب للأورام إلا أنها لا توجد بقطعة الـ T-DNA، والنباتات التى جرحت بطريقة ما هى الأكثر عرضة بصفة خاصة للإصابة بالبكتيريا

الزراعية،حيث تفرز النباتات المجروحة مركبات فينوليـــة ذات أوزان جزيئيـــة منخفضة،تعمل على تنشيط الجينات البكتيرية الخبيثة.

والشرط الثانى لإدخال د.ن.أ البكتيريا الزراعية إلى الخلايا النباتيـــة،هو أن الــــ د.ن.أ الذى سينقل،يجب أن يحاط بمجموعة من "التسلســـلات المتكاملـــة" والتى يصل طولها إلى ٢٥ قاعدة مزدوجة، ويمكن لخلايا البكتيريـــا الزراعيـــة التى تأوى الجينات الخبيثة الأساسية،نقل أية قطعة د.ن.أ،سواء أكانت بلازميـــداً أو موقعاً كروموسومياً،شريطة أن يكون مرتبطا بالتسلسلات المتكاملة.

وتتعرف بعض منتجات الجينات الخبيثة على التسلسلات المتكاملة وتحـــدث بها قطوعات خيطية مفردة، وهذا يؤدى بدوره إلى تكون نســـخ د.ن.أ خيطيـــة مفردة من د.ن.أ فى خلايا البكتيريا الزراعية بين التسلسلات المتكاملة، وفـــى النهاية ينتقل الــــ د.ن.أ وحيد الخيط إلى خلية النبات، ويندمج مـــع مجموعـــة العوامل الوراثية الخلوية على أنه د.ن.أ مقحم ذو خيط مزدوج، كيف يحدث هذا النقل، وما هى الآلية التى يقحم بواسطتها الـــ د.ن.أ ذو الخـــيط المفـــرد إلـــى مجموعة العوامل الوراثية لخلية النبات،لا تزال غير مفهومة.

وعلى الرغم من أن قطعةالــــT-DNA،التى تدخلها البكتيريا الزراعية عادة إلى الخلايا النباتية،تحتوى على الجينات التى يتطلبهـــا تخليـــق الأوبـــينopine وإحداث الورم،فإن هذه الجينات ليست مطلوبة لنقل وإدخال الــــ د.ن.أ . هـــذا الهدف الذى تستقل فيه تماماً المعلومات الوراثية للإصابة ونقل الجين عن الهدف المطلوب من أجل تكوّن أورام التدرن التاجى،يعتبر هدف مفيـــد فـــى تصـــميم متجهات لإدخال جينات جديدة إلى النباتات، ويمكـــن الـــتخلص مـــن الجينـــات المطلوبة لإحداث الورم،والتى قد تضر النباتات المستقبلة لها فـــى المتجـــه دون التأثير على قدرته على الانتقال بواسطة البكتيريا الزراعية، ويمكن أن يعمل أى

تسلسل د.ن.أ تحيط به تسلسلات متكاملة معينة كمتجه الذى سينتقل من خلايا البكتيريا الزراعية إلى خلايا النبات، ويمكن أن تحمل هذه المتجهات ما لا يقل عن أربعين كيلو من قواعد من د.ن.أ، تكفى للتشفير عن حوالى عشرة جينات.

كانت الجينات الأولى التى حاول الباحثون استخدامها للانتقال مع المتجهات المشتقة من البلازميد المسبب للأورام جينات بكتيرية تشفر عن مقاومة المضادات الحيوية، وقد نجحت التجارب بمعنى أن متجه الـ د.ن.أ قد دخل الخلايا النباتية واندمج مع مجموعة العوامل الوراثية الخلوية، ومع ذلك، فلم تصنع المنتجات البروتينية للجينات البكتيرية فى الخلايا النباتية،ولا منتجات الجينات الغريبة الأخرى للكائنات الراقية. وعلى سبيل المثال، فإن جين الخميرة المشفر عن إنزيم alchol dehydrogenase وجينات الحيوانات الثديية المشفرة عن بروتين بيتا-جلوبين والإنترفيرون قد فشلوا فى العمل، وقد كشف تحليل ر.ن.أ الرسول للأنسجة النباتية التى احتوت على هذه الجينات الغريبة عن أنه لم ينسخ منها شيء إلى ر.ن.أ الرسول، الذى يعتبر أولى خطوات تخليق البروتين.

وأظهرت دراسات عديدة عن تعبير الجين،أن للجينات تسلسلات منظمة، تقع عادة قبل بداية المناطق المشفرة عن البروتين،وهى لازمة لبدء عملية النسخ، وفشل الجينات البكتيرية والمختلطة والثديية فى أن تعبر فى الخلايا النباتية أوحى بأن التسلسلات المنظمة لهذه الجينات،لم تكن تتعرف عليها آلية النسخ النباتية، وعند هذه النقطة أصبح من الواضح أنه،إذا كان على الجينات الغريبة أن تعمل فى الخلايا النباتية،فسوف يحل محل تسلسلاتها المنظمة الطبيعية التسلسلات المنظمة للجينات النباتية.وأنشئت بعد ذلك الجينات الكميريةchimaeric gencs ،التى ارتبطت فيها إشارات نسخ من جينات تعرف بأنها تعبر فى الخلايا النباتية

بالتسلسلات المشفرة للجينات البكتيرية المقاومة للمضاد الحيوى، وعّبرت الجينات الكميرية في الخلايا النباتية لكى تعطيها ميزة اختيارية؛بمعنى أنه يمكن التعرف على الخلايا التى تحتوى على الجينات نظرًا لقدرتها على النمو فى وجود مضاد حيوى معين، ولا تزال تحتوى عادة المتجهات المشتقة من البلازميد المسبب للأورام على جينات مقاومة للمضاد الحيوى،كعلامات اختيارية بالإضافة إلى أى جين آخر قد يرغب الباحثون فى نقله، ويستخدم نظام البكتيريا الزراعية حالياً فى إدخال جينات جديدة إلى العديد من أنواع النباتات المختلفة،التى تشمل الطباق والبتونيا والطماطم والبطاطس والبرسيم الحجازى وفول الصويا.

استخدام الفيروسات النباتية كمتجهات جينية وكنظم تكبير جينية محتملة

Plant viruses as gene vectors and potential gene amplification systems

يعتبر استخدام الفيروسات كمتجهات لنقل الجينات إلى النباتات فى مستهل مراحله،مقارنة بتطوير الفيروسات المستخدمة لإدخال جينات إلى الخلايا البكتيرية والثديية، وقد كان تطور الفيروسات النباتية كمتجهات تطوراً بطيئاً إلى حد بعيد ،لأن الغالبية العظمى تحتوى على مجموعة عوامل وراثية من ر.ن.أ. ولا توجد سوى مجموعتين من الفيروسات النباتية-caulimoviruses وgeminiviruses لها د.ن.أ كمادة وراثية ، وقد استغل أفراد من كلتا المجموعتين لإكثار وتعبير الجينات الغريبة فى الخلايا النباتية.والفيروسات من مجموعة caulimoviruses التى يعتبر فيروس فسيفساء القرنبيط(Ca MV) أحد أفرادها ،هى فيروسات د.ن.أ نباتية "ارتجاعية"، حيث تستخدم الفيروسات عادة

القدرات التخليقية للخلايا التى تصيبها لكى تتكاثر بها ، ولما كان فيروس فسيفساء القرنبيط يتضاعف كل فترة فى خلايا نباتية متمايزة ،يتوقف فيها تخليق الـ د.ن.أ ، فقد أنشأ الفيروس نظاماً ذا مرحلتين لنسخ الـ د.ن.أ الخاص به، المرحلة الأولى، نسخ مجموعة العوامل الوراثية فيروس فسيفساء القرنبيط ، التى تحتوى على ثمان كيلوات من قواعد الـ د.ن.أ المزدوجة الخيط فى داخل مجموعة العوامل الوراثية للـ ر.ن.أ الموجودة داخل نواة الخلية العائلة، ومجموعة العوامل الوراثية للـ ر.ن.أ هذه ،تنسخ بالتالى فى وضعها الأصلى داخل د.ن.أ ذى الخيط المزدوج،عن طريق إنزيم ترانسكربتاز عكسى يشفر عن الفيروس.

ولا يعتبر فيروس فسيفساء القرنبيط نظاماً وحيداً للنسخ، لكنه أيضاً يظهر ازدواجاً نقلياً غريباً لثلاث جينات على الأقل ،تضع بعض القيود الخطيرة على استخدام الفيروس فى تعبير الجينات الغريبة فى النباتات، فلا توجد سوى جينات صغيرة لا يزيد طول قواعدها عن ٣٠٠ قاعدة مزدوجة وتخلو من الإنترونات introns ،التى تظل ثابتة ويعبر عنها فيروس فسيفساء القرنبيط، والجين الوحيد الذى يمكن أن يحل محله جين غريب،هو ذلك الجين المشفر عن عامل اكتساب أفيد aphid،وهو بروتين ضرورى لانتشار الفيروس فى الطبيعة.

والجينات التى عبر عنها بنجاح بعد إدخالها فى الخلايا النباتية بواسطة فيروس فسيفساء القرنبيط ،جين بكتيرى يسمى dihydrofolate reductase وجين الإنترفيرون البشرى، بالإضافة إلى ذلك، تحتوى مجموعة العوامل الوراثية فيروس فسيفساء القرنبيط على محرضين قويين لتعبير الجين فى الخلايا النباتية

اللذين غالباً ما يوصلان بمتجهات أخرى،تشمل البلازميد المسبب للأورام ،للحث على تعبير الجينات الغريبة فى النباتات.

وتتكون مجموعة العوامل الوراثية للمجموعة الثانية مـن فيروسـات د.ن.أ النباتية،geminiviruses ، من إما واحد أو اثنين من جزيئيات د.ن.أ وحيدة الخيط ودائرية، ويتحول الـــ د.ن.أ الفيروسى ذو الخيط الواحد الذى يصل طوله من ٢,٦ إلى ٣ كيلو من القواعد فى نواة الخلايا النباتية إلى صـورة ناسـخة مـن الخيط المزدوج عن طريق آلية غير معروفة حتى الآن، وتتراكم العديـد مـن النسخ من الصورة الناسخة لمجموعة العوامل الوراثيـة لفيـروسgeminivirus داخل نوى الخلايا المصابة، ولا توجد دلالة حتى الآن تشير إلى مرحلة نسـخ عكسى فى نسخgeminivirus .

وتظهر فيروساتgeminiviruses سلسلة عائل أكثر امتداداً من السلسلة التى تظهرها فيروساتcaulimoviruses، وهذا يجعل من فيروسـاتgeminiviruses أكثر ملاءمة للتطبيق العام كمتجهات لإدخال جينات جديدة فى النباتات، وعلـى الرغم من أنه لا يعرف الكثير عن جيناتgeminiviruses ولا عن وظائفهـا ،إلا أن هناك دلالة حديثة توحى بأن الجين المشـفر عـن بـروتين كابسـيدcapsid الفيروسى،قد تحل محله جينات غريبة،دون التدخل فى نسخ مجموعة العوامـل الوراثية للفيروس.

ويجرى تطويرgeminivirus الحبوبى،فيروس قزامة القمح، كمتجه لإدخـال جينات إلى الحبوب، وعلى الرغم من أن طول الكروموسوم الوحيد فى فيروس قزامة القمح يبلغ ٢,٧ كيلو من القواعد،إلا أنه رغم ذلك يستطيع التكيف ويدخل

جينات نسخ،يصل طولها حوالى ٣ كيلو من القواعد، وبهذه الطريقة فربما يصل طول الــ د.ن.أ الفيروسى إلى الضعف.

ونسخت جينات بكتيرية ثلاث أدخلت إلى مجموعة العوامل الوراثية لفيروس قزامة القمــح بنجــاح،وّعبرت بعــد النقــل داخــل خلايــا مســتزرعة مــن الحبوب،كالحنطة وحيدة الحبةTriticum monoccum والذرة، وهذا يفسر إمكانية استخدامgeminiviruses كأساس للتعبير عن وحدات نسخ بصورة مســتقلة فــى النباتات.

الامتصاص المباشر للد.ن.أ بواسطة الخلايا النباتية

Direct uptake of DNA by plant cells

نقل الجين إلى جبلة الخلية النباتية

وفرت المتجهات الجينية المستمدة من البلازميد المســبب لــلأورام وســيلة لاختبار نشاط الجينات العلامية الكميرية المختارة فى النباتات، فبمجرد أن يظهر جين كميرى معين نشاطاً فى الخلايا النباتية،ويضفى ميزة اختياريــة للخلايــا المستقبلة،يمكن استخدامه فى التجارب التى تستهدف طرق أكثر مباشرة لإدخال الجينات المعزولة إلى النباتات.

وعلى سبيل المثال، فقد تم نقل الجينات العلامية الكميرية إلى جبلات الخلايا دون حاجة لمساعدة المتجهات،وهى الخلايا النباتية التى أزيلــت منهــا الجــدر السلولوزية الصلبة، وهناك العديد من البروتوكولات المتوفرة حاليــاً لإدخــال جينات جديدة إلى جبلات خلايا سلسلة متنوعة من النباتات التى تشــمل علــى ثنائيات الفلقة، والطباق و البتونيا والجزر،والقمح وحيد الفلقة والذرة.

وفى كل هذه الحالات، فإن جبلات الخلايا قادرة على التطور داخل نوع غير متمايز من النسيج يسمى الكالوس، ويمكن أن تتجدد النباتات كلها المحتوية على الـــد.ن.أ المنقول بعض أنسجة الكالوس المتكون على هذه الصورة ، وتــنجح هذه الطريقة مع كالوس الطباق ومع كالوس النباتات ثنائية الفلقة،لكنها لا تنجح مع الحبوب.

وغالباً ما يدخل الـــ د.ن.أ الغريب فى موقع كروموسومى واحد فى الخلايا النباتية،بالرغم من أنه من غير المحتمل أن يندمج فى مواقع متكررة، وفى معظم الحالات،فإن وراثة الـــ د.ن.أ تتبع قوانين مندل للوراثة،ومع ذلك،فغالباً ما يواجه الـــ د.ن.أ المندمج عدة ترتيبات مختلفة،والتى يحتمل أن تتم قبل أن يندمج مع مجموعة العوامل الوراثية النباتية، وقد يجعل هذا من النقل المباشر للـــ د.ن.أ إلى داخل جبلات الخلايا، الوسيلة الأقل تفضيلاً لإدخـــال د.ن.أ غريـــب إلـــى الخلايا النباتية عن النقل بالبكتيريا الزراعية.

نقل الجينات العلامية المختارة بواسطة الحقن

Transfer of selectable marker genes by injection

يرغب علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية فى تطبيق الطرق الجديـــدة لنقـــل الجين على التعديلات الوراثية للحبوب،التى تعتبر المحاصـــيل الرئيســـة فـــى الزراعة، بيد أن البحث كان محبطاً،حيث لم يظهر أن البكتيريا الزراعية تصيب الحبوب، ولأن محاولات تجديد النباتات كلها من جبلات الخلايا الحبوبيـــة قـــد باءت بالفشل- على الرغم من أن هذا الموقف قد يتغير حالياً، حيـــث أخبـــرت

مجموعات بحثية فى انجلترا وفرنسا واليابان عن تجديد جـبلات خلايـا الأرز (انظر الفصل العاشر).

ويجرى حاليا استكشاف عدة طرق ،كطرق بديلة لنقل الجينات إلى النباتـات الحبوبية، وتشمل هذه الطرق استخدام فيروسات الـــ د.ن.أ كمتجهات جينيــة، وامتصاص الـــ د.ن.أ من خلال جدران الخلية اللقاح المنبت، وحقن الـــ د.ن.أ فى الخلايا الجرثومية قبل أن تقوم بعملية الانقسام الاختزالى[2]،وهــو صــورة لانقسام النواة التى ينتصف فيها عدد الكروموســومات،كمقدمة لتكــوين خلايـا البويضة والحيوان المنوى.

وفى الآونة الأخيرة،حصلت أليشيا دو لا بيناAlicia de la Pena مــن معهـد ماكس بلانك على بعض النتائج الأولية الواعدة لنقل الجين إلـى نبـات الشـيلم بطريقة حقن، وتقع الخلايا الجرثومية لنبات الشيلم فى عنقود زهــرى يعــرف بالنورة. وتستطيع المواد المحقونة داخل النورة اختــراق الخلايـا الجرثوميـة النامية، وعلى سبيل المثال،فإن حقن مواد كيميائية، مثل البنين[3]، والكولشيسين يخترق الخلايا ويحدث بها تشوهات إنمائية .

ولكى تختبر دو لا بينا ما إذا كان الـــ د.ن.أ سيخترق الخلايا أيضاً، فقـد قامت بحقن النورات ببلازميدات د.ن.أ، تتكون أساساً من جين يشفر عن مقاومة

[2]ــ انقسام اختزالى(وهو هبوط الصبغيات إلى النصف،فتصبح النواة الشقية أى التزاوجية بسـيطة الصـبغيات أو أحادية الصبغياتhapliod حتى إذا اندمجت النواتان الشقيتان عاد عدد الصبغيات مزدوجًا فى النواة الأم فتصير ثنائيـة الصـبغياتdiploid،وهنـاك التـى تسـمى ثلاثيـة الصـبغياتtriploid،ورباعيـة الصبغياتtetraploid،وكثيرة الصبغيات أو متضاعفة الصبغياتpolyploid).

[3]ــ بنين(قلوانى أى شبه قلوى يستخرج من ثمر البن.وهو منبه ومقو عام يحقنون به تحت الجلد).

المضاد الحيوى الكاناميسينkanamycin، والبذور التى نتجت فـــى النهايـــة تـــم فرزها بعد ذلك لمقاومة الكاناميسين،عن طريق إنباتهـــا فـــى وجـــود المضـــاد الحيوى، وأنتجت العبوة الأولى التى استمدت من حوالى ٣٠٠ بذرة،والتى جاءت من ٧٠ نورة شيلم محقونة، ثلاث بادراتseedlings التى احتوت وعبرت عـــن جين مقاومة الكاناميسين، وعلى الرغم من أن هذا النجاح الأولى يجب اعتبـــاره نجاحاً ابتدائياً، وفى حاجة إلى التكاثر،فتوضح النتيجة أنه يمكن احتمال تطـــوير الطرق البسيطة لإدخال جينات غريبة إلى نباتات الحبوب.

العنـــاصر الانتقـــالية كمتجهـــات جينيـــة محتمـــلة

Transposable elements as gene vectors

قد يسمح الاستنساخ من الذرة والنباتات الأخـــرى ذات العناصـــر الانتقاليـــة العديدة بأن تتطور كمتجهات لإدخال جينات جديدة إلـــى النباتـــات، وتتحـــرك العناصر الانتقالية بصورة طبيعية خلال مجموعات العوامل الوراثية للنباتـــات العائلة،إذ تدخل أولاً فى أحد الأماكن ثم تنتقل إلى مكان آخر، وقد بين العنصـــر الانتقالى للذرة مؤخراً بأنه قادر على تغيير وضعه فى نبات عائل جديـــد مثـــل الطباق، وهناك تجارب حالية فى مرحلة تقدم لاختبار ما إذا كانـــت العناصـــر الانتقالية المعزولة التى تحمل جينات علاميـــة مختارة،ســـوف تنـــدمج داخـــل مجموعة العوامل الوراثية للخلية النباتية،إذا أدخلت العوامل إلى جبلات الخلايـــ أو حقنت داخل النورات.

متجهـــات لدراســـة تعبيـــر الجيـــن النبـــاتى
ectors for studying plant gene expression
جينات نباتية تعبر بصفة دائمة

تحاط القطع المشفرة عن البروتين فى جينات الكائنات الراقية بتسلسلات تنظم تعبير الجين، وتقع عادة التسلسلات المنظمة فى جينات الخميـــرة والحيوانـــات والمطلوبة من أجل البدء الدقيق للنسخ فى الاتجاه الصاعد من البدايـــة، أو فـــى التسلسلات غير المشفرة عن البروتين الموجودة فى معظـــم جينـــات الكائنـــات الراقية ، بالإضافة إلى ذلك، تحتوى التسلسلات فى اتجاه الهابط عند النهاية فى المناطق المشفرة على إشارات لإنهاء النسخ،ولتعديلات جزيئات ر.ن.أ رســـول معينة ،التى تعتبر أساسية من أجل التغير الطبيعى إلى بروتين.

وكما ذكرنا من قبل،لم تعمل الجينات البكتيرية والحيوانية فى النباتات،عندما انتقلت الجينات مع تسلسلاتها المنظمة، ومع ذلك، فقد تمكن الباحثون من إنشاء جينات وظيفية مختلطة ،كانت تحاط فيها المناطق المشفرة عن الجينـــات غيـــر النباتية بالتسلسلات المنظمة للجينات فى الاتجاه الهابط والصاعد، التـــى تعتبـــر نشطة فى معظم أن لم يكن كل أفراد سلسلة كبيرة من النباتات، وقد تم الحصول على هذه التسلسلات المنظمة من جينات البلازميد المســـبب لـــلأورام ، مثـــل التسلسلات المشفرة عن تخليق الأوبينopine،ومن جينـــات فيـــروس فسيفســـاء القرنبيط، وأنشئت متجهات تعبير،كانت فيها التسلسلات المنظمة فـــى الاتجـــاه الهابط والصاعد مفصولة بواسطة د.ن.أ رابط،الذى يمكن أن يســـتخدم فـــى إدخال المنطقة المشفرة عن أى جين مرغوب.

ويتوفر حالياً متجهات عديدة من هذا النوع،وقد تم استخدامها لنقل مجموعـــة مختلفة من جينات علامية مختارة داخل النباتات، تتضمن جينات عديدة مقاومة للمبيد العشبى وللمضاد الحيوى، وتعتبر الجينات التى تنقلها هذه المتجهات عادة

فى كل المراحل التطورية،و فى كل أنسجة النباتات التى تكتسبها، والحالات العرضية التى تكون فيها الجينات ساكنة، يحتمل أن تكون نتيجة للاندماج فى جزء ساكن من الناحية النسخية فى مجموعة العوامل الوراثية المستقبلة، أو بسبب التعديلات الكيميائية التى تخمد نشاط الجينات الكميرية .

الجينات النباتية التى لا تعبر إلا فى ظروف معينة
Plant genes that expressed only under certain conditions

لا يعبر العديد من الجينات النباتية بشكل دائم ، لكنها لا تنشط إلا فى أنسجة معينة أو فى مراحل تطورية، أو عندما تنشط من خلال محفز معين مثل الضوء والحرارة، وكخطوة منطقية أخرى فى إنشاء الجينات الكميرية،يبحث علماء البيولوجيا الجزيئية النباتية ما إذا كانت التسلسلات الحاكمة الصاعدة لهذه الجينات المنتظمة ستعمل بطريقة طبيعية عندما ترتبط بجينات غريبة تنقل إلى النباتات. ولن تؤدى التجارب من هذه النوعية فقط إلى فهم أفضل للتحكم الجينى النباتى،بل يمكنها أن تقدم أيضاً معلومات مفيدة عن الهندسة الوراثية النهائية للنباتات، وسوف يعتمد الإدخال الناجح للعديد من الصفات الجديدة إلى النباتات دون أدنى شك على ما إذا كانت الجينات منظمة بطريقة طبيعية فى النبات المستقبل.

وتم الحصول على بعض التسلسلات النظامية الصاعدة من جينات نشطت استجابة للضوء، ويوجد من بين هذه الجينات، جينان نوويان يشفران عن البروتينات المطلوبة للتمثيل الضوئى، حيث يوجه جينrbcS تخليق أصغر الوحدتان الفرعيتان من ribulose-١ و bisphospate ٥-bisphospate ، وهو

الإنزيم الذى يحفز الخطوة الأولى فى المسار الذى يحول ثانى أكسيد الكربون إلى سكر، ويشفر جينLHCP عن البروتين الرابط a/b للكلوروفيل الجامع للضوء،الذى لا ينشط إلا بعد أن ينتقل إلى جبيلة اليخضور التى يحدث بها التمثيل الضوئى.

وجينا البازلاءrbcS وLHCP،لا يصلا إلى كامل نشاطهما إلا فى أنسجة مثل الأوراق الخضراء، تحتوى على يخضورات نشطة، وتنتقل إشارة الضوء التى تسبب تنشيطهما إلى الجينين بواسطة صبغ فيتوكروم، وتنتقل الإشارة إلى جينrbcS أيضاً من خلال متقبل يستجيب للضوء الأزرق.

وقد أظهرت دراسات عديدة أن التسلسلات التى تمكن هذه الجينات الحساسة للضوء من الانتظام بطريقة دقيقة،توجد بداخل بضع مئات من قواعد د.ن.أ المزدوجة،التى تقع تماماً فى الاتجاه الصاعد من بداية المناطق المشفرة. وعندما تتصل هذه التسلسلات المنظمة من جينات البازلاءrbcSوLHCP بالتسلسلات المشفرة عن البروتينات الغريبة،تسلك الجينات المختلطة الناتجة مسلك جيناتrbcS وLHCP الطبيعية، وبمعنى آخر، إن البروتينات الغريبة لا تصنع إلا فى أوراق ينشطها الضوء ذات يخضورات كاملة النمو، وأوضح البحث أيضاً أن التسلسلات المنظمة من جين LHCP،تعمل كمخفضات لتعبير الجين فى الجذور، بالمقارنة بتأثيراتها المعتمدة على تنشيط الضوء فى الأوراق.

وجينchalcone synthase،الذى يحفز أحد الخطوات الأساسية فى تخليق الفلافونيد،يمثل نوعاً آخر من الجينات المنتظمة بالضوء، ولمركبات الفلافونيد التى تتوفر بكثرة فى النباتات العديد من الوظائف المهمة، فبالإضافة إلى

استخدامها كصبغ للزهرة،فإنها تعتبر من الآليات الدفاعية للنبـات، ويمكـن أن تعمل الفلافونيديات كعوامل مضادة للميكروب لحماية النبات ضد الضرر الناشئ عن زيادة الأشعة فوق البنفسجية.

وينشط جين chalcone synthase الموجود فى الطباق بواسطة إشـعاع مـن الضوء فوق البنفسجى لمدة ٢٠ ساعة، وتقع التسلسلات المنظمة المطلوبة لهـذا التنشيط مرة أخرى فى المنطقة الصاعدة المحيطة بـالجين، ويمكـن إنشـاء الجينات المختلطة من خلال جمع تسلسل صاعد لجين chalcone synthase مـع تسلسل مشفر غريب، وتنشط هذه الجينات المختلطة من خلال تعرضها الطويل لإشعاع الضوء فوق البنفسجى،تماماً مثـل تعـرض جـين chalcone synthase الطبيعى.

وبعض الجينات لا تنشط بواسطة الضوء لكنها تنشـط بواسـطة درجـات الحرارة المرتفعة، ومن بين هـذه الجينـات مركـب مـن جينـات"الصـدمة الحرارية"،ويبدو أن تنشيطها يحمى الخلايا من الضرر الذى قـد ينشـأ نتيجـة درجات الحرارة الأعلى من درجات الحرارة العادية، وعندما تـدخل الجينـات الكميرية إلى النبات والتى تحتوى على التسلسل المنظم لجين الصدمة الحرارية ،فلا تنشط هذه الجينات أيضاً إلا بارتفاع درجات الحرارة .

ويقتصر تعبير العديد من الجينات النباتية على أجزاء معينة،مثل الأوراق أو البذور أو الدرنات أو العقد المثبتة للنتروجين الموجودة فى جـذور البقوليـات، والمناطق المحيطة الصاعدة لجينات محددة لعضو ،قد تم استخدامها أيضاً فـى إنشاء جينات مختلطة ، وعندما تنتقل الجينات الكميرية إلى النباتات،فإنها تعبـر

عادة بنفس تخصص العضو،مثل الجينات الأصلية التى تم الحصول منها على المناطق المنظمة الصاعدة .

ويمكن استخدام المناطق المنظمة المحددة للعضو فى تغيير موقع تعبير الجينات النباتية، وعلى سبيل المثال،يشفر جين باتاتينpatatin عن أحد بروتينات التخزين الرئيسة لدرنة البطاطس،فى حين يمكن أن يتغير تخصص نسيج جين الباتاتين،بحيث يتم التعبير عنه فى البطاطس أو أوراق الطباق،عن طريق إحلال تسلسله المحيط الصاعد بأحد الجينات المحددة لورق الطباق.

وتوضح هذه التجارب أيضاً أن التسلسلات المنظمة ليست محددة للأنواع، فالتسلسل من الجين الطباق المحدد للورق يعمل فى البطاطس بنفس الطريقة التى يعمل بها فى الطباق نفسه، وحتى جيناتphaseolin،التى تشفر عن بروتينات تخزين بذور الفول تعبر بنفس تخصصها الطبيعى عن البذور،عندما تنقل إلى نباتات الطباق، وعلى ذلك يجب أن تتشابه تماماً الآلية المخلقة للبروتين وإشاراتها المتعرفة فى الأنواع النباتية المختلفة.

وعلى الرغم من وقوع معظم جينات الكائنات الراقية فى داخل النواة،فإن بعض الجزيئات العضويةorganelles-الفتائل الخيطيةmitochondria لجميع الخلايا ويخضورات الخلايا النباتية- لها مجموعة عوامل وراثية صغيرة، وتشفر مجموعة العوامل الوراثية للفتائل الخيطية وجبيلة اليخضور عن بعض بروتينات هذه الجزيئات العضوية،فى حين تشفر الجينات النووية عن البروتينات الأخرى، ويجرى تخليق البروتينات التى تحددها الجينات النووية فى السيتوبلازم،وبعد ذلك يجب نقلها إلى مستقرها الأخير فى الفتائل الخيطية أو

جبيلة اليخضور، وتحمل هذه البروتينات تسلسلات ببتيدية محددة،تستخدم لتوجيهها إلى الجزيئة العضوية الصحيحة وبعد ذلك تنفصل.

ويمكن توجيه البروتينات الغريبة لكى تنتقل إلى جبيلات اليخضور عن طريق إنشاء جينات مختلطة تحمل التسلسل المشفر عن ببتيد جبيلة اليخضور الناقل، والجين rbcS الذى ذكرناه من قبل،يشفر عن بروتين جبيلة اليخضور ribulose-١،٥-bisphosphate carboxylase ،يقع داخل النواة ويحمل تسلسلاً مشفراً مناسباً لببتيد عبور، فعند وصل تسلسل rbcS الناقل بجين كاناميسين مشفر عن المقاومة للمضاد الحيوى ،يجعل منتج هذا الجين المختلط ينتقل إلى جبيلة اليخضور كما هو متوقع.

وإذا توفرت القدرة لتوجيه البروتينات التى تنتجها الجينات الغريبة إلى جزيئات عضوية محددة،مثل جبيلة اليخضور،يمكن أن يصبح شيئاً مفيداً جداً. فإنتاج سلالات المحاصيل النباتية ذات المقاومة المتزايدة للمبيد العشبى،تعتبر أحد أهداف الهندسة الوراثية النباتية، وبإدخال جين غريب فى مجموعة العوامل الوراثية لليخضور،قد يكون من الأمور الصعبة جداً،ولكن إذا كان الجين يحمل تسلسل ناقل مناسب،فيجب أن ينقل منتجه إلى جبيلة اليخضور،بالرغم من انتهاء رحلة الجين نفسه فى النواة، وقد تعتمد محاولات تحسين التمثيل الضوئى أيضاً على القدرة على الحصول على بروتينات موجهة إلى جبيلة اليخضور.

وأوضحت أبحاث عديدة حالياً أنه يمكن استخدام المتجهات التعبيرية فى إنشاء الجينات المختلطة التى ستعبر عند نقلها إلى النباتات، وبإدماج تسلسلات تحكم مناسبة فى الجينات المختلطة ،يستطيع الباحثون التأكد من استجابة الجينات

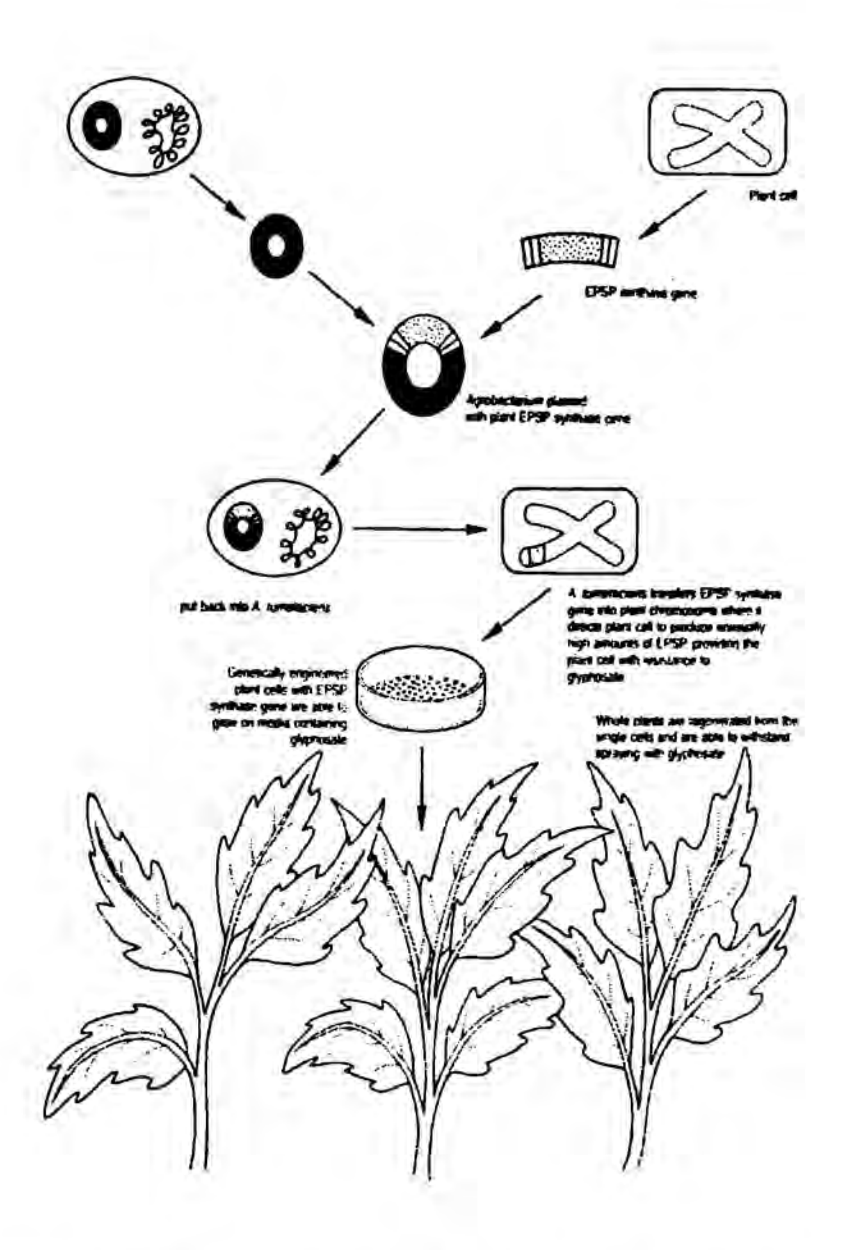
الموجودة فى النبات المستقبل عند الحاجة إلى حوافز بيئية مثل الضوء ودرجة الحرارة،وأن المنتج سوف يصنع فى أنسجة محددة.

هندسة القدرة على احتمال المبيد العشبى فى النباتات

The engineering of hcrbicide tolerance in plants

لقد ظهرت أهمية نظام البكتيريا الزراعية فى إنتاج سلالات نباتية ذات خصائص جديدة يمكن أن تكون مهمة للمزارعين، ففى حالة حديثة وثيقة الصلة بالموضوع،استخدم الباحثون هذا النظام فى هندسة نباتات ذات مقاومة متزايدة للجليفوسيتglyphosate،وهو المكون الفعال فى المبيد الحشري"Roundup" التى تنتجه شركة مونسانتو (شكل ١١ــ٣).

وتستخدم المبيدات العشبيةHerbicides على نطاق واسع فى الزراعة فى مكافحة الأعشاب، ومع ذلك فإن استخدام الجليفوسات محدود، ويقتصر استخدامه حالياً فى مكافحة الأعشاب المتناثرة على جوانب الطرق وفى الاستخدامات الأخرى غير الزراعية ،لأن هذا المبيد،يقضى على المحاصيل النباتية بصورة فعالة مثل قضائه على الأعشاب، ويمكن تحسين قيمة الجليفوسات كعامل مضاد للأعشاب فى الزراعة،إذا أمكن هندسة المقاومة لذلك المبيد بطريقة انتقائية فى المحاصيل النباتية. فالجليفوسات يصبح فعالاً عند تركيزات منخفضة جداً،ولا يسبب سموماً للحيوانات الثديية،وسرعان ما يتحلل فى التربة بواسطة الكائنات المجهرية.



شكل ١١ - ٣ نقل الجين إلى النباتات بواسطة بكتيريا الأورام الزراعية، يوضح المخطط كيف يمكن استخدام البكتيريا فى إنتاج نباتات مقاومة للجليفوسيت،وهو المكون النشط فى المبيد العشبيRound-upبيد أنه يمكن إدخال جينات أخرى بطرق مشابهة .

ويبيد الجليفوسيت النباتات بإعاقة الجين المشفر عن إنزيم EPSP سينساز، الذى تحتاجه النباتات لتخليق الأحماض الأمينية الأساسية، ولجعل النباتات مقاومة لجين المبيد العشبى،فإن جين EPSP سينساز يوصل أولاً بإحدى طرق الـ د.ن.أ المطعم داخل البلازميد المسبب للأورام فى بكتيريا الأورام الزراعية، ويعاد إدخال البلازميد المطعم فى الخلايا البكتيرية، التى تصيب خلايا النباتات شديدة التأثر، مثل البتونيا أو الطباق أو الطماطم، وكنتيجة للإصابة فإن جزء البلازميد المسبب للأورام الذى يحمل جين EPSP سينساز يدخل الخلايا النباتية، و تصنع الخلايا التى تكتسب الجين الجديد كميات كبيرة من الإنزيم وبذلك يمكنها أن تنمو فى وجود تركيزات الجليفوسيت التى يمكنها أن تبيد خلايا النباتات العادية. ويمكن حينئذ أن تتجدد النباتات كلها المقاومة للجليفوسيت من الخلايا.

آليات مقاومة الجليفوسيت

Mechanisms of glyphosate resistance

يحدث الجليفوسات تأثيراته فى المسار المؤدى إلى تخليق الأحماض الأمينية العطرية،الفنيلالانين phenylalanine و التيروسين tyrosine والتريبتوفان tryptophan. فإذا حرمت خلية من هذه الأحماض الأمينية،فلن يمكنها تخليق البروتينات ومن ثم تموت، والنباتات والبكتيريا والفطور لهاهذا المسار،ولذلك تتعرض لتأثيرات الجليفوسات؛ومع ذلك،لا تصنع الثدييات تصنع أحماضها الأمينية العطرية بنفسها- ويجب عليها أن تكتسبها من الغذاء التى تتناوله-وبذلك لا تتعرض لتأثيرات الجليفوسات.

وفى عام ١٩٨٠،استطاع نيكولاس أمرهين Nicholas Amrhein وزملاؤه فى جامعة رهر فى بوشم بألمانيا الغربية أن يتعرفوا على-enolpyruvyl-٥) (shikimate-٣-phosphate، والذى يعرف بـ(EPSP) synthase،على أنه الإنزيم الذى يكبحه الجليفوسات فى البكتيرAerobacter aerogenes، وأظهرت دراسات لاحقة أن المبيد العشبى يكبح الإنزيم نفسه فى النباتات الراقية،الذى يحفز تفاعل رئيس فى المسار التخليقى للأحماض الأمينية العطرية.

وأوحت هذه النتائج بأنه يمكن جعل النبات والخلايا الأخرى تتحمل تأثير الجليفوسات،عن طريق تغيير إنزيمEPSP synthase ،بحيث يرتبط الإنزيم بالمبيدات العشبية بصورة أقل فعالية ونتيجة لذلك، يكون أقل عرضة للكبح، ويمكن إجراء طريقة بديلة لتحمل الجليفوسات عن طريق زيادة إنتاج EPSP synthase. وفى كلتا الحالتين، سيكون مطلوب المزيد من المبيد العشبى لكى يحدث كبحًا كاملاً.

وقد تم اتباع كلا نوعى التحمل، وعلى سبيل المثال،فقد تم عزل الطفرات المقاومة للجليفوسات من بكتيريا Salmonella typhimurium و A.aerogenes ،وظهر أنها تحتوى على صور من الـ P synthase،الذى يكون أقل تأثرًا لكبح المبيدات العشبية.

وفى حالات أخرى،كان الإنتاج المفرط من الإنزيم سبب فى القدرة على التحمل المتزايد للجليفوسات فى الخلايا البكتيرية والنباتية، وفى الآونة الأخيرة تعرف كل من ديليب شاهDilip Shah وروبرت فريليRobert Fraley وزملاؤهما فى شركة موسانتو على سلالة من خلايا هجن البتونيا تتحمل الجليفوسات،والتى نشأت من خلال زراعة الخلايا فى تركيزات متزايدة من المبيد العشبى، ويتأثر

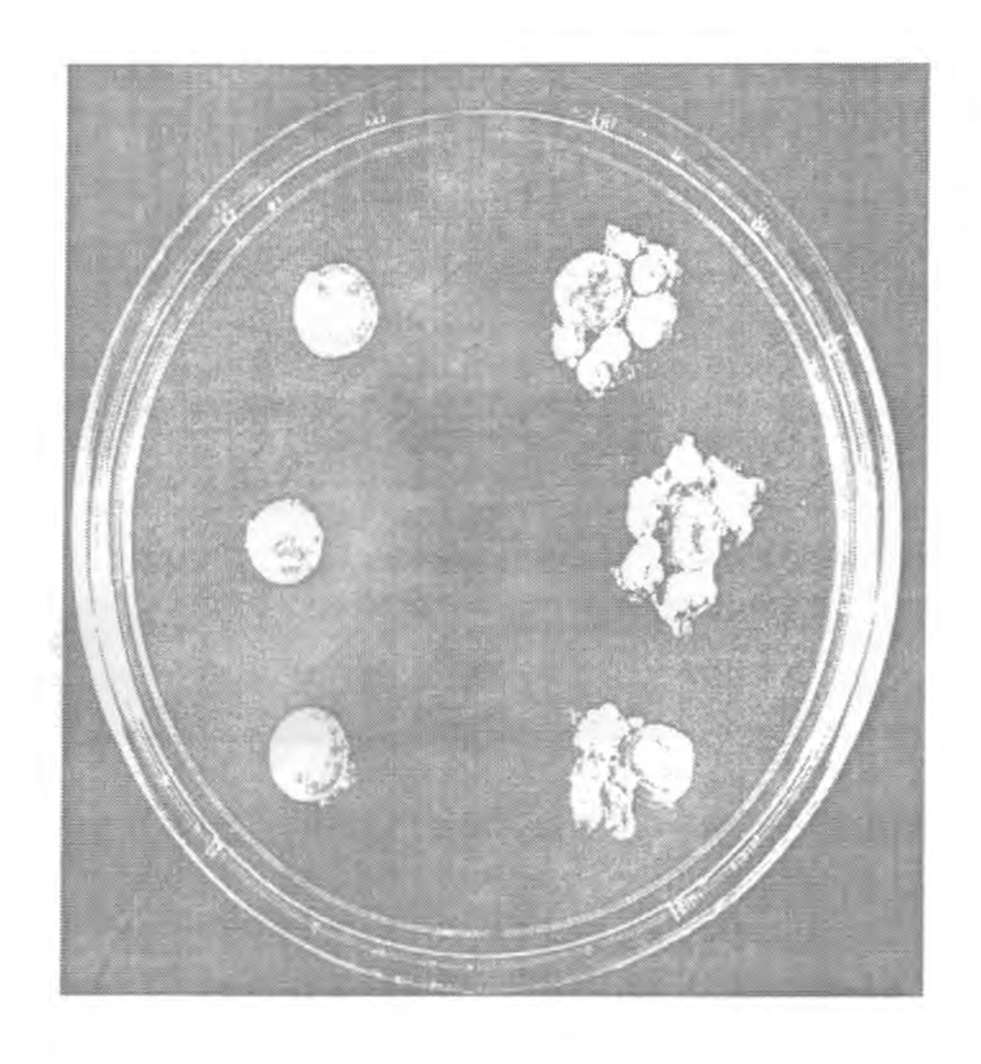
إنزيمEPSP synthase الذى تم صنعه من سلالة هذه الخلايا بالمبيد العشبى،لكنه ينتج بمقادير تصل ١٥-٢٠ مرة مما ينتج منه فى الأحوال العادية. وباستخدام مجس د.ن.أ مستنسخ لجينEPSP،أوضح باحثو شركة مونسانتو أن الجين قد تم تكبيره، وكانت النتيجة أن احتوت الخلايا علي٢٠ مرة عدد النسخ الطبيعى، وازداد أيضاً ر.ن.أ الرسول المناظر بحوالى ٢٠مرة،وأدى بالتالى إلى إنتاج مفرط من البروتين الإنزيمى، وقد يكون تكبير جينEPSP synthase الآلية الجزيئية الأساسية لعدد من سلالات الخلايا النباتية التى تم اختيارها لتحمل الجليفوسات. وتستخدم خلايا الكائنات الراقية عادة تكبير الجين لحصول على متطلباتها من كميات متزايدة من منتجات جينية محددة، وقد تسهم فى تحمل الخلية النباتية لمبيدات عشبية غير الجليفوسات، وتعرف مؤخراً هوارد جودمان Howard Goodmanوزملاؤه فى المستشفى العام بماساشوستس فى بوسطن على سلالة خلية برسيم حجازى مقاومة للمبيد العشبيl-phosphinothricin ، وقد أوضحوا أنها تحتوى على جين مكبر يشفر عن الإنزيم المستهدف لهذا المبيد العشبى.

الحصول على نقل جين له القدرة على احتمال المبيد العشبى
Achieving gene transfer of herbicide tolerance

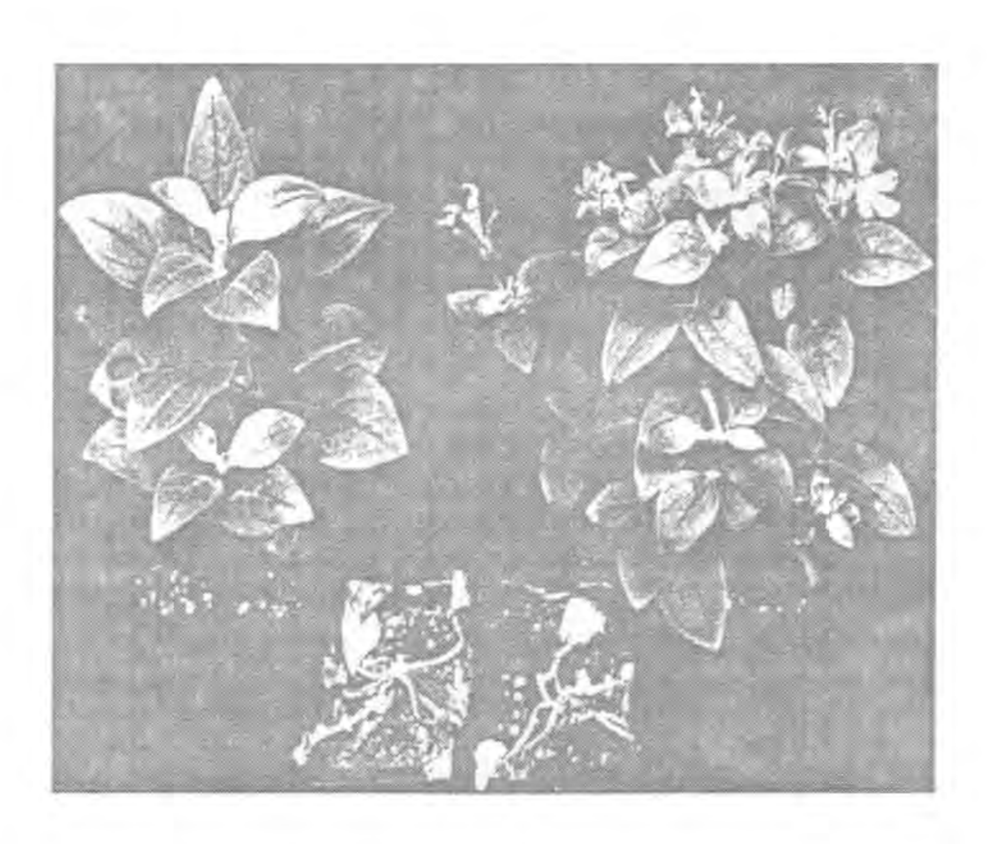
تقترح الملاحظات التى تمت على خلايا البتونيا المتحملة للجليفوسات،أنه من الممكن الحصول على نباتات تتحمل المبيد العشبى عن طريق تغييرها وراثياً،بحيث يمكنها أن تنتج إنزيمEPSP synthase بصورة مفرطة، ولتحقيق هذا الهدف،أنشأ فى البداية باحثو شركة مونسانتو،ستيفن روجرز Stephen Rogersوهارى كليى Harry Kleeجيناً كميرياً ،حيث وضعوا فيه تسلسل مشفر

عن البروتين لجينEPSP synthase،تحت سيطرة تسلسل منظم من فيروس فسيفساء القرنبيط، وبعد ذلك جينEPSP synthase الكميرى فى خلاياA.tumafaciens،كجزء من البلازميد المسبب للأورام الذى ألغيت منه الجينات المحدثة للورم، ونقل الجين الكميرى بواسطة البكتيريا إلى خلايا البتونيا الموجودة فى أقراص ورقية،بطريقة قام بتطويرها هورشHorsch، وأنتجت الأقراص الورقية التى انتقلت باكتساب الجين الكميرى كالوس، استطاع أن ينمو فى وسط مزرعى محتوى على جليفوسات،بينما لم يستطع كالوس الأقراص الورقية الحاكمة أن ينمو(شكل ١١-٤).

ونتج تحمل نسيج الكالوس المنقول من الإنتاج المفرط لإنزيم EPSP synthase.وتجددت النباتات المحتوية على الجين الكميرى من نسيج الكالوس المنقول،ورشت بمبيد الجليفوسات بجرعة تعادل ٠,٨رطلاً لكل فدان إنجليزى الذى يعادل تقريباً أربعة أمثال الجرعة المطلوبة للقضاء على النباتات من النوع البرى، وقاومت النباتات المنقولة رش المبيد،ونمت حتى نضجت، بينما ماتت النباتات الحاكمة (شكل ١١-٥).



شكل ١١-٤ اختيار الكالوس المتحمل للجليفوسات، أصيبت الأقراص الورقية الموضوعة على اليمين ببكتيريا A.tumefaciens،الذى حمل متجها مع جين EPSP مختلط ، ونقلت البكتيريا الجين إلى خلايا القرص الورقى،التى تستطيع تكوين كالوس فى وسط يحتوى على الجليفوسات، وأصيبت أيضا الأقراص الورقية فى يسار الصورة ببكتيريا الأورام الزراعية A.tumefaciens ، ولكن لم تحمل البكتيريا فى هذه الحالة جين EPSP، وظلت الخلايا النباتية متأثرة بالمبيد العشبى ولم تكون الكالوس فى وجوده.



شكل ١١-٥ نباتات بتونيا لديها القدرة على احتمال الجليفوسات. النباتات الموجودة فى أعلى الصورة، التى اكتسبت جين EPSP مختلط عن طريق نقله من بكتيريا الأورام الزراعية تحملت الرش بالجليفوسات ونمت حتى النضج،فى حين توقفت النباتات الحاكمة(أسفل الصورة) عن النمو وماتت.(ملحوظة النباتات الحاكمة،هى النباتات التى لم تعالج بنقل الجين).

يحدث التخليق الحيوى للأحماض الأمينية العطرية فى جبيلة اليخضور، ويصنع إنزيم EPSP synthase فى سيتوبلازم الخلية،ولذلك يجب أن ينقل إلى جبيلة اليخضور، وكشف تحليل تركيب نسخة د.ن.أ من ر.ن.أ رسول لإنزيم EPSP synthase،عن أنه عندما يتم تخليق الإنزيم فى البداية،فإنه يحمل ببتيد عبور يصل طوله ٧٢ حمضاً أمينياً.

وأوضح جانيش كيشور Genesh Kishore وجوى ديلا-كيوبا Guy della-Cioppa من شركة مونسانتو،أن إنزيم EPSP synthase المخلق حديثاً،الذى يحتوى

على ببتيد عبور،تمتصه الجيلات اليخضورية المعزولـــة،فى حـــين لا تمـــتص البروتينات التى ليس بها ببتيد عبور ، واقترح الباحثون أن الإنزيم الذى ينتجـــه جين كميرى فى نباتات البتونيا ،التى يجب أن تحتوى على ببتيد عبور يتمركز فى الجبيلات اليخضورية للخلايا النباتية.

وفى الآونة الأخيرة أيضاً قام لوكا كوماى ودافيد ستالكر وزملاؤهمـــا فـــى شركة كالين فى دافيذ بكاليفورنيا،بإجراء هندسة وراثية لنباتات لها تحمل متزايد للجليفوسات، ومع ذلك فقد استخدم هؤلاء الباحثون جيناً بكتيرياً يحـــدد شـــكلاً طافراً من إنزيم EPSP synthase،يكون أقل تأثراً للمبيد العشبى عـــن الإنـــزيم الطبيعى، ولم يكن بالبكتير الإنزيمى ببتيد العبور اللازم للانتقال إلـــى جبـــيلات اليخضور،ولكن على الرغم من ذلـــك زاد مـــن مقاومـــة النباتـــات المهندســـة للجليفوسات، ومن المرجح أن ركيزة الإنزيم تتحرك من الجبيلة اليخضورية إلى السيتوبلازم،حيث يمكن أن يؤثر عليها إنزيم EPSP synthase البكتيرى،بعد ذلك يعود المنتج إلى الجبيلات اليخضورية ليتحول إلى أحماض أمينية عطرية.

وبغض النظر عن الطريقة المستخدمة،فقد أوضح الباحثون حالياً بجـــلاء أن نقل الجين، يمكن أن يحسن من تحمل النباتات للمبيد العشبى،على الأقل بالنسبة للمبيدات العشبية التى تكبح تفاعلات الإنزيم الواحد.

إنتاج نباتات مقاومة للفيروس بواسطة نقل الجين
The production of virus-resistant plants by gene transfer

يعد إنتاج سلالات نباتية جديدة ذات مقاومة محسنة للأمراض المعدية،هـــدف رئيس آخر لمربى النبات،الذى يمكن تحقيقه بواسطة طرق نقل الجين، وعلـــى

سبيل المثال،فقد نشأ تعاون بين الباحثين من جامعة واشنطن وشركة مونسانتو لاستخدام نظام نقل جين البكتيريا الزراعى فى إنتاج نباتات الطباق والطماطم ذات المقاومة المتزايدة لفيروس فسيفساء الطباق،ذلك الفيروس الذى يسبب مرضاً يجعل لأوراق النبات المصابة مظهر الفسيفساء.

وأثبتت النتائج صحة التوقع الذى اتجه إليه علماء البحث منذ سنوات قليلة؛ألا وهو أنه من الممكن إنتاج نباتات تقاوم الأمراض عن طريق نقل جين أو عدة جينات إليها، وبحثوا أيضاً احتمالية أن تنجح طرق نقل الجين فى تحسين المقاومة للأمراض البكتيرية والفطرية فى النباتات.

آليات مقاومة المرض

Mechanisms of disease resistance

لا يعرف حالياً سوى النذر اليسير عن الآليات الوراثية لمقاومة المرض فى النباتات، وأحد الاحتمالات،هو أن النباتات المقاومة لكائن ممرض،تحمل جين أو عدة جينات محددة يمكنها أن تنتقل إلى النباتات المصابة،وبالتالى تحسن من مقاومة النباتات المصابة، إلا أنه لم يقم أى باحث بعزل مثل هذا الجين، لأن التفاعلات بين الطفيليات وعوائلها تفاعلات معقدة جداً.

وهناك ملاحظة أجريت فى عام ١٩٢٩، قام بها المرحوم H.H.McKinny،عندما أشار إلى طريقة أخرى ممكنة لزيادة لمقاومة النباتات للكائنات الممرضة، فقد ذكر ماكنى أنه عندما يصاب نبات بأحد السلالات الفيروسية فإنه يقاوم الإصابة بسلالة ثانية، وقد أدى هذا الاكتشاف إلى أن يعكف

علماء الأمراض النباتية على البحث عن الفيروسات التى تسبب أعراضًا معتدلة أو لا تسبب أعراضًا على الإطلاق عندما تصيب النباتات.

والنباتات التى تصاب بسلالة فيروسية معتدلة،غالباً ما تكون محمية من سلالة فيروسية أكثر خبثاً،وخصوصا عندما يكون الفيروسان منتسبين لبعضهما البعض. وتحمل هذه الظاهرة التى تعرف بالحماية المتبادلةcross-protection على الأقل صورة ظاهرية للحماية من الأمراض الحيوانية بواسطة اللقاح ، ولما كانت الحماية المتبادلة أكثر فاعلية مع الفيروسات المتشابهة،فقد استخدمت فى تحديد درجة العلاقة بين الفيروسات.وقد استخدمت الحماية المتبادلة بطريقة ناجحة فى الزراعة، وتشمل الأمثلة الملحوظة على حماية الطماطم المزروعة فى الصوبة الزجاجية ضد فيروس فسيفساء الطماطم؛ وحماية محاصيل الحمضيات ضد فيروس الحمضtristeza؛وحماية نباتات الباباز ضد فيروس باباز ringspot.

ومع ذلك، فإن لاستخدام أسلوب الحماية المتبادلة على نطاق واسع فى الزراعة مساوئه، أولاً، إنه يتطلب الانتشار الواسع لفيروس فى البيئة المزروعة-وهو تطبيق يرى العديد من الزراعيين أنه غير عملى، ثانياً،قد تنشأ سلالة خبيثة من سلالة فيروسية معتدلة وتحدث نقصًا كبيراً فى المحصول بدلاً من حمايته، ثالثاً،الإصابة حتى بفيروس معتدل قد يسبب نقصاً ولو أنه قليل إلا أنه ملحوظ فى إنتاجية المحاصيل، وأخيرا،تعتمد الحماية المتبادلة على عزل وتشخيص سلالة فيروسية معتدلة ملائمة،والتى غالباً ما تتطلب جهداً كبيراً. واقترح علماء الأمراض النباتية عدداً من الفروض المختلفة لتفسير الآليات الجزيئية للحماية المتبادلة. تقترح أحد هذه الفروض أن الفيروس الأول يتدخل

بطريقة ما فى نسخ الـــــ ر.ن.أ للفيروس الثانى فى خلايا الحمايـــة المتبادلـــة، ولكل الفيروسات النباتية تقريباً مجموعة عوامل وراثية من ر.ن.أ،ويوقف هـــذا التدخل بشكل مؤثر دورات حياتها، وربما يحدث التدخل،لأن جزيئـــات ر.ن.أ لفيروسين يرتبطان بعلاقة وثيقة لدرجة أن ر.ن.أ الفيروس الأول يمكنـــه أن يهجن بكمية صغيرة من ر.ن.أ الفيروس الثانى،ويحدث إصابة مبكرة تمنع سواء نسخه أو تحوله إلى بروتين، والصورة البديلة،فقد يستغل الفيروس الأول بطريقة ما آلية نسخ الـــــ ر.ن.أ،وبالتالى يبطئ أو يمنع تكاثر الفيروس الثانى.

وتقترح مجموعة فروض أخرى أن الحماية المتبادلة توقف حدوث عدوى من الفيروس الثانى، وقد يحدث هذا من خلال منع الفيروس من التعرف أو الارتباط بمتقبله على سطح الخلية،ويكون من نتيجة ذلك أن يفشل فى دخول الخلية، أو قد يكبح بطريقة ما، تفكيك الفيروس وإطلاق مجموعة عوامله الوراثية مـــن ر.ن.أ داخل الخلية.

إنتـــاج نباتـــات مقاومـــة للفيـــروس
The production of virus resistance plants

على الرغم من أن الحماية المتبادلة قد فهمت بأية حال،فقد أوضـــح روجـــر بيكيRoger Beachy من جامعة واشنطن،بالاشتراك مع فرالى وروجـــرز أنـــه يمكن استخدام نقل الجين لإحداث حالة فى النبات تشبه تقريباً الحماية المتبادلـــة الطبيعية التـــى تحـــدثها العـــدوى الفيروســـية، واختـــارا فيـــروس فسيفســـاء الطباق(TMV)للعمل فى هذه التجارب ،حيث أمكن دراسة الفيـــروس بصـــورة مستفيضة، وقد مكن هذا باحثو جامعة واشنطن،باتريشيل بويللا-أبـــل Patricia Powell-Abel وبارون ديBaron De، من إنتاج نســـخة د.ن.أ مـــن مجموعـــة

عوامل وراثية ر.ن.أ من TMV،وللتعرف وعزل الجين الذى يشفر عن الطبقة البروتينية الفيروسية.

وقاموا بوصل جين طبقة البروتين بتسلسلات د.ن.أ أخرى، توفر الإشارات المطلوبة لبدء وإنهاء النسخ فى الخلايا النباتية، وأدخل الجين الكميرى الناتج فى بلازميد مسبب للأورام ، استؤصلت منه الجينات المحدثة للورم، بعد ذلك استخدمت شيلا ماكورميك Shcila McCormick من شركة مونسانتو بكتيريا الأورام الزراعية لنقل البلازميد المسبب للأورام مع الجين الكميرى إلى خلايا الطماطم والطباق.

وتجددت النباتات من الخلايا التى اكتسبت الـ د.ن.أ الجديد، وسمح للنباتات التى نتجت بهذه الطريقة بأن تزهر ،ونبتت البذور التى نتجت منها، ونضجت البادرات[4] التى نتجت بصورة طبيعية، ولم تظهر عليها أية صفات شاذة.وعندما حضنت بادرات طباق وطماطم صغيرة جداً مع فيروس فسيفساء الطباق ، والتى نقلها ريتشارد نلسون Richard Nelson بواسطة جين كميرى فى جامعة واشنطن،فلم تطور النباتات عدوى،أو إن أعراض المرض تطورت بصورة أبطأ مما يحدث فى النباتات الحاكمة(شكل ١١-٦). وتتكرر هذه التجارب حالياً،وقد تم تأكيدها بأكثر من ١٠٠٠ بادرة نتجت عن طريق عدة نباتات أصلية متحولة مختلفة.

كانت جميع التجارب التى أجريت حتى الآن، تتم فى ظل ظروف محكمة إما فى غرف بيئية فى المعمل أو فى الصوب الزجاجية، وأظهرت النباتات التى نمت فى ظل ظروف أكثر طبيعية فى الصوب الزجاجية درجة أعلى لمقاومة

[4]ـ بادرة: البادرة اصطلاح اشتهر فى مصر، وهى فى اللغة رأس النبات أول ما يتفطر، ومعناه بالإنجليزية الغرس الناشئ من بذور بذرت.

فيروس فسيفساء الطباق عن تلك النباتات التى نمت فى غرف بيئية،وهى نتيجة تفترض أنه يبدو أن مقاومة النباتات فى الظروف الحقلية يكــون أفضــل مــن المقاومة المشاهدة بالفعل.

لا يزال السؤال المطروح ،هو ما إذا كانت المقاومة فى النباتات المتحولة هى نفس المقاومة الموجودة فى النباتات التى أجريت لها حماية متبادلة ضد العدوى الفيروسية، وعلى الرغم من أن عدم معرفة الإجابة،إلا أن نــوعى المقاومــة يظهران تشابها، السبب الأول،كلاهما يسبب تأخر تطور المرض، وفــى حالــة النباتات المتحولة،يكون التأخير أساساً نتيجة لنقص حوالى ٩٠-٩٥% فى عــدد مواقع الإصابة على النبات، وبعض النباتــات قاومــت الإصــابة تمامــاً، وإذا استشرت الإصابة،فسوف يبطىء انتشار الفيروس بسبب مقاومة النبات.





شكل ١١-٦ نباتات الطباق المقاومة للفيروس، فى صورة(a) يحمل النبات فى يسار الصورة الجين الكميرى لطبقة بروتين فيــروس فسيفساء الطباق؛ وبعد عشرة أيام من إصابة النبات بالفيروس،لا تزال أوراقه سليمة، وفى المقابل فأوراق النبات فى يمين الصورة،والتى لا تحتوى على جين فيروس فسيفساء الطباق،بدأت تظهر أعراض مرض فيروس فسيفساء الطباق، فى الصورة (b) تظهر النباتات بعد ١٤ يوما من إصابتها،والنبات الموجود فى يمين الصورة قد تحول بجين الطبقة البروتينية لفيروس فسيفساء الطباق؛ بينما لم يتم تحول النبات فى يسار الصورة.

والسبب الثانى،يمكن للمقاومة أن تتغلب جزئياً فى كلا النباتــات المتحولــة وذات الحماية المتبادلة عن طريق زيادة تركيز الفيــروس فــى مــادة التلقــيح

الاختبارية، بالإضافة إلى ذلك،يمكن للمقاومة أن تتغلب جزئياً أيضاً فـــي كــلا نوعي النبات إذا كانت تحتوى مادة التلقيح الاختبارية على ر.ن.أ فيروسى بدلا من الجزيئات الفيروسية الكاملة.

وأخيراً، فالمقاومة التى اكتسبتها النباتات المتحولة تنشـــط ضـــد ســـلالةU1 المشهورة وسلالة فيروس فسيفساء الطباق الأكثر شدة،بالإضافة إلـــى ســـلالات عديدة من فيروس فسيفساء الطماطم، وتنشط الحمايـــة المتبادلـــة أيضـــاً ضـــد السلالات الفيروسية وثيقة الصلة بالفيروس المعدى الأول،وعادة ما تختفى عندما تتناقص درجة القرابة، ومع ذلك،فلما كانت الدراسات لم تشمل بعـــد ســـلالات فيروس فسيفساء الطباق أكثر بعداً من حيث القرابة،فلا يزال الوقت مبكراً جداً لمعرفة ما إذا كان سينطبق نفس الشيء على المقاومة التى يحدثها نقـــل جـــين فيروس فسيفساء الطباق، وعلى ذلك،تظهر المقاومة فى النباتات التـــى تحولـــت نتيجة ذلك رغماً عن ذلك أن لها العديد من السمات المشتركة مع المقاومة فـــى النباتات ذات الحماية المتبادلة ضد الأمراض الفيروسية.

استخدام مقاومة الأمراض المهندسة وراثيا فى الزراعة

. Application of genetically disease resistance to agriculture

يمكن إحداث مقاومة ضد مرض فيروس فسيفساء الطباق فى نباتات الطبـــاق والطماطم عن طريق نقل الجين، وهناك طريقة هندسة وراثية مشابهة -تتم من خلالها إدخال جين مشفر عن طبقة بروتين فيروسية فى نبات، قد تكون فعالة فى حماية أنواع نباتية إضافية ضد الفيروسات الأخرى.

وهناك أمل كبير فى أن توجد طريقة مماثلة تثبت فعاليتها أيضاً ضد مسببات المرض البكتيرية والفطرية، فالحماية ضد هذه العوامل يمكن الحصول عليها عن طريق نقل جين فطرى أو بكتيرى لفيروس خبيث داخل النباتات المستهدفة،على الرغم من أن هذا أيضاً لا يزال غير واضح.

فإحداث المقاومة عن طريق نقل جين فيروسى أو فطرى أو بكتيريا داخل المحاصيل النباتية،من المفترض إلا يحدث نشاطا أو حيوية للنباتات المستقبلة، إلا أنه لا يمكن تقييم هذا الاهتمام إلا باختبار موسع فى ظروف الصوبة الزجاجية وفى النهاية فى الظروف الحقلية.

سلالات جديدة من نباتات مقاومة للحشرات
Making new strains of insect resistance

تحدث بكتيرياBacillus thuringiensis بوغات بللورية لها تأثير طبيعى مبيد للحشرات ، فعندما تتغذى يرقات الحشرات على البوغات،تطلق البللورات البوغية بروتينات ذات وزن جيئى عالى، وعندما تهدم الإنزيمات هذه البروتينات هدماً جزيئياً داخل القناة الهضمية،فإنها تطلق بروتينات أصغر تسمم اليرقات، ويرقات الحشرات التى تهلك من هضمها لبوغاتBacillus thuringiensis،تشمل بذلك على يرقات البعوض والذباب، وتتأثر العديد من يرقات الفراشات التى تصيب وتدمر المحاصيل النباتية وأوراقها أيضاً بهذا البكتير.

وقد كانت مستحضرات منBacillus thuringiensis متوفرة لعدة سنوات،واستخدمت فى مكافحة حشرات مثل البعوض والفراشة الغجرية، وكانت اليرقات الشرهة من النوع الأخير الآكلة للورق تحدث تأثيرات مدمرة على

أوراق النبات فى الجزء الشمالى الشرقى من الولايات المتحدة،وقــد انتشــرت الآفة بشكل سريع فى بقية البلاد بواسطة السيارات والشاحنات.

ومن مميزات استخدامBacillus thuringiensis فــى مكافحــة الحشــرات،إن تأثيرات سمومه القاتلة لا تصيب إلا الحشرات المستهدفة، وهو بذلك يعتبر مبيداً حشرياً آمناًعن المبيدات الحشرية الكيميائية التى تسمم مجموعــة كبيــرة مــن الكائنات،تضم الطيور وأنواع الحياة البرية الأخرى،والحشرات النافعة والضارة، ومع ذلك،فالمبيدات الحشرية الناتجة مــنBacillus thuringiensis لهــا بعــض العيوب منها،أنها مرتفعة الثمن وسرعان ما تتحلل فى ظروف الحقل.

ونتيجة لذلك،بدأ الباحثون فى استكشاف طرق جديدة لاستخدام سموم Bacillus thuringiensis فى مكافحة الحشرات، وتشمل إحدى هذه الطرق التــى يجــرى تجريبها إدخال جينات سموم مستنسخة إلى البكتيريا الأخرى،التى قد تدوم لفترة أطول فى البيئة عنBacillus thuringiensis نفسه(انظر أيضا الفصل الثــامن)، وهناك طريقة أخرى تتضمن إنشاء نباتات مبيــت بــداخلها الســموم المبيــدة للحشــرات، وأخيراً،استنســخ م.فيــكM. Vaeck وج. ليمــانسJ.LeemaNS وزملاؤهما فى النظم الوراثية النباتية فــيN.V بجنــت ببلجيكــا،جين بلــورى منBacillus thuringiensis يشفر عن بــروتين لــه وزن جزيئــى ١٣٠٠٠٠، والبروتين المنقى عبارة عن سم يصيب يرقات دودة قــرن الطبــاق Manduca sexta والفراشات البيضاء الكبيرةPieris Brassicae مثل البلورات البوغية ذاتها. عندما يتعرض البروتين بكامله للإنزيمات الهاضمة للبروتين مثل، تريبســين أو كيموتريبسين،تنطلق كسرة صغيرة ذات وزن جزيئى ٦٠٠٠٠،تقــاوم الهضــم الإضافى ويبدو أنها السم النشط، والبروتين الأصغر، والذى يتكون مــن كــل

نصف الحمض الأمينى النهائى تقريباً للجزيء الأكبر،يظهـر النشـاط السـمى الكامل للبروتين الأصلى.

واستخدم باحثو جهنت فى الآونة الأخيرة البلازميد المسبب للأورام فى إدخال جين التوكسين المستنسخ إلى نباتات الطباق، وصنع منتج الجين البكتيرى فـى أنسجة النباتات التى اكتسبت الـــ د.ن.أ الغريب، وبدت النباتات طبيعية فى كل السمات الأخرى.

واحتفظ البروتين الذى نتج فى الطباق بسميته للحشرات، وماتت جميع يرقات دودة قرن الطباق التى تغذت على الأوراق المنتجة للسم فى غضون أسبوع،فى حين أن أقل من ٥% من اليرقات التى تغذت على أوراق النباتات الحاكمة قـد ماتت أثناء نفس الفترة.

وعلاوة على ذلك،فقد حمى إنتاج البروتين السام كل النباتات ضد الأضـرار التى تنجم من الحشرة، وفى اختبارات الصوبة الزجاجية،وضعت ١٥ يرقة من يرقات دودة قرن الطباق حديثة الفقس،على كل من نبات طباق بلغ طوله ٤٠سم ، وظهرت على النباتات الحاكمة أضرار كبيرة فى غضون أسبوع واسـتهلكت بالكامل بعد أسبوعين، وفى المقابل، ماتت اليرقات التى وضعت فوق النباتـات المهندسة وراثياً فى غضون ٤ أيام،وكان تأثيرها الضار على النبات ضئيلاً(شكل ١١-٧). ولا يزال هناك بحث آخر مطلوب لتحديـد مـا إذا كانـت النباتـات المهندسة وراثياً لإنتاج السم البكتيرى،محمية أيضاً من الضرر الذى يحدث فـى الظروف الحقلية.

وقد تم عزل عدد كبير من سلالات B. thuringiensis ،التى تحدث السموم ذات النشاط المبيد الحشرى ضد مجموعة كبيرة مختلفة من أنواع الحشرات، وربما يأتى يوم،يصبح من الممكن إجراء هندسة وراثية لأنواع مختلفة من المحاصيل النباتية،المدخل فيها السموم المضادة للحشرات،المحددة للآفات الحشرية التى تتغذى على تلك النباتات.



شكل ١١- ٧ نبات مقاوم للحشرات مهندس وراثيا، استخدم البلازميد المسبب للاورام لادخال جين سام من بكتيريا B.thuringiensis إلى نبات الطباق الموجود فى يمين الصورة، وأنتجت اوراق النبات البروتين السام،الذى قضى على يرقات انواع حشرية معينة عندما هضمتها، ووضعت ١٥ يرقة من دودة قرن الطباق على كل نبات. ماتت اليرقات التى وضعت على النبات المهندس وراثيانتيجة التهمها الأوراق، ولم تحدث سوى أضرار ضئيلة للنبات، وفى المقابل، تجردت النباتات الحاكمة غير المعدلة فى يسار الصورة تماما من الأوراق ،بسبب اليرقات الطاحنة للأوراق.

النتـــائج :

ثبت أن نظام بكتيريا الأورام الزراعية A.tumefaciens لإدخال جينات جديدة للخلايا النباتية هو الوسيلة الفعالة والمعتمد عليها لإجراء الهندسة الوراثية لعـــدد كبير من المحاصيل النباتية، وقد استخدم بالفعل فى إنتاج سلالات جديـــدة مـــن النباتات المقاومة للأمراض والمبيد العشبى، وربما يكون القيد الـــرئيس علـــى تطبيق نظام متجهA.tumefaciens ،هو عدد الجينات القليلة نسبياً التى يمكـــن أن يحملها، والصفات التى يشفر عنها بواسطة العديد من الجينات،من المحتمـــل أن تكون أقل استجابة للنقل بواسطةA.tumefaciens عن تلك الصفات التـــى تشـــفر عنها جين أو جينات قليلة.

وهناك قيد أيضاً على استخدام البكتير لنقل الجين، ويجرى أيضـــاً تطـــوير طرق أخرى لزيادة سلسلة المحاصيل النباتية التى تخضع لأساليب نقل الجـــين، وتشمل هذه الطرق الحقن المباشر بـــالـــــ د.ن.أ،واستخدام الفيروسات النباتيـــة كمتجهات، ويعتبر الإيضاح الأخير،بإمكانية تجديد نباتـــات الأرز كلهـــا مـــن الجبيلات اليخضورية،تطوراً مشجعاً آخر للهندسة الوراثية لوحيدات الفلقة.

وعلى الرغم من ذلك،فإنه لا يمكن الحصول على هندسة وراثيـــة لصـــفات جديدة فى النباتات إلى أن يتم التعرف وعزل الجينات التى تشـــفر عـــن هـــذه الصفات، وقد تأخرت دراسات البيولوجيا الجزيئية للنبات عن اللحاق بدراســـات البيولوجيا الجزيئية للبكتيريا والحيوانات،لكن هذا الموقف قد بدأ فـــى التغيـــر، ويقدم بحث نقل الجين إلى النباتات دافعا للأبحاث فى البيولوجيا الجزيئية للنبات والوسائل الجديدة التى يتحقق بها هذا الهدف .

الفصل الثاني عشر

الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ وتطبيقاتها

Monoclonal antibodies and their applications

على الرغم من أن للبحث النظرى هدفا أساسيا وهو حل بعض المشاكل العلمية الأساسية ،إلا أنه غالبا ما يعود بفوائد عملية مهمة. ويوضح عدد قليل من الاكتشافات هذه الفرضية أفضل مما توضحه اكتشافات تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ،التى كانت تنطلق بخطى سريعة من البحث المعملى إلى التطبيق الإكلينيكى والتجارى منذ أن أصبحت موجودة فى منتصف السبعينيات.

وتعد الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أكثر فعالية وإنتاجية إلى حد بعيد عن الأجسام المضادة المصنوعة بالأساليب التقليدية. وهذه المميزات تجعلها نموذجية فى تشخيص الأمراض المعدية،خصوصا عندما يكون التمييز بين مسببات الأمراض وثيقة الصلة ببعضها مسألة مهمة، وقد تساعد الأجسام المضادة أيضا على تشخيص السرطان، فهى تستخدم حالياً بالفعل فى مراقبة تطور المرضى الذين يعالجون من أنواع سرطانية معينة،وهناك دلالات على أن الأجسام المضادة تكتشف الانتكاسات فى وقت مبكر قبل أن تكتشفها طرق التشخيص الأخرى.

وقد وافقت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية US Food and Drug Administration حتى الآن على ما يزيد على ١٥٠ جسما مضادا أحادى الاستنساخ لأغراض التشخيص. والعديد من هذه الأجسام المضادة لتشخيص

الأمراض المعدية،والبعض منها لمراقبة تقدم علاج السرطان. وبالإضافة إلـــى ذلك، تستخدم الأجسام المضادة فى تحديد تركيزات الدم بدقة للعقاقير العلاجيـــة ولبعض الهرمونات. وتعتمد اختبارات الحمـــل الحديثـــة أيضـــا،والتى تشـــتمل الاختبارات المعدة للاستخدام فى المنـــازل علـــى الأجســـام المضـــادة أحاديـــة الاستنساخ.

وتبدأ الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى أن تجد لها تطبيق فـــى عـــلاج الأمراض بمثل ما تستخدم فى التشخيص. ولا تزال هنـــاك محـــاولات جاريـــة لاستخدامها فى علاج السرطان. وينعقد الأمل على الأجسام المضـــادة أحاديـــة الاستنساخ، بما لها من تخصص دقيق، فى أن تسلك مسلك "الطلقات الســـحرية" ممتدة المفعول،التى يمكنها البحث عن الخلايا السرطانية وإبادتها دون أن تلحق أضرارا كبيرة بالخلايا الطبيعية. وقد أشارت نتائج التجارب الإكلينيكية بصـــفة عامة إلى خلاصة مؤداها أن هذا الهدف سيصعب تحقيقه،فى حين كانت النتائج رغما عن ذلك واعدة بدرجة كبيرة لتجعل مـــن البحـــث يســـتحق أن يواصـــل مساعيه.

وأحد التطبيقات الإكلينيكية للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ الذى ثبـــت جدواه هو الكبت المناعى لزرع الكلى. ففى خلال صيف عـــام ١٩٨٦،وافقـــت هيئة الأغذية والدواء الأمريكية علـــى أن يعطـــى أول جســـم مضـــاد أحـــادى الاستنساخ إكلينيكيا للمرضى. وهذا الجسم المضاد الذى أنتجتـــه شـــركة أرثـــو الدوائيةOrtho Pharmaceutical Company فى راريتـــان بولايـــة نيوجرســـى بالولايات المتحدة، قد تم توجيهه ضد الخلايا المناعية التى تسبب رفض الطعـــم

النسيجى ،وسوف يعالج به مرضى زرع الكلى الذين يعانون من سلسلة عمليات رفض.

اكتشاف الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

The discovery of monoclonal antibodies

بدأت قصة الجسم المضاد أحادى الاستنساخ فى عام ١٩٧٤،عندما كان جورجيه كوهلر Georges Kohler وقيصر ميلشتين[١] Cesar Milsteinمن معمل البيولوجيا الجزيئية التابع لمجلس الأبحاث الطبى MRC فى كمبردج بإنجلترا، يدرسان ما كانت تعتبر آنذاك إحدى المشكلات القائمة فى المناعة المتعذرة الحل. والأجسام المضادة هى جزء من دفاعات الجسم ضد الأجسام الغريبة، التى تشتمل الكائنات العضوية المسببة للمرض. فعندما تحفز الخلايا اللمفية B[٢] بالجهاز المناعى من خلال وجود كائنا مسبب للمرض أو من مادة غريبة أخرى،فإنها تنتج أجساما مضادة، وهى البروتينات التى تتعرف وترتبط بدقة بالمادة التى تسببت فى البداية على تحفيز إنتاجها. ويؤدى هذا الارتباط ما بين الجسم المضاد والمستضد (المستضد antigen،هو الاسم الذى يطلق على أى مادة تحفز إنتاج الجسم المضاد) إلى تدمير المستضد .

[١] قيصر ميلشتين: (١٩٢٧-) عالم بيولوجيا جزيئية بريطانى، ولد فى بوينس أيرس بالأرجنتين. كانت أبحاثه الأساسية فى إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. وقد شارك فى الحصول على جائزة نوبل فى علم وظائف الأعضاء أو الطب عام ١٩٨٤.

[٢] الخلية اللمفية: نوع من خلايا الدم البيضاء، توجد فى الدم والأوعية اللمفية والطحال والعقد اللمفية. وتتصف الخلايا اللمفية إلى خلايا لمفيةB مستمدة من نخاع العظم(خلايا B) والخلايا اللمفية المستمدة من الغدة التيموسية(الخلاياT). ولهذا الخلايا دورا أساسيا فى إنتاج الأجسام المضادة.

والمشكلة هى أن الجهاز المناعى يمكنه أن ينتج أجساما مضادة لسلسلة ضخمة من المستضدات . ويحتوى المستودع الكامل من الأجسام المضادة على ما يربو عشرة ملايين جسما مضادا من أنواع مختلفة،و ليست مجموعة العوامل الوراثية الحيوانية بالاتساع الكافى حتى تحتوى على جينات فردية لكل بروتينات الأجسام المضادة المحتملة. وبدا ذلك تحدى أمام أحد العقائد الرئيسية للبيولوجيا الجزيئية من أنه يوجد جين متفرد لكل سلسلة بروتين.

بيد أنه يمكن إنتاج جزءا على الأقل من تنوع الجسم المضاد ،خاصة وإن كانت جينات الأجسام المضادة تميل للتطفر. فلو كانت الجينات تطفر بحرية مثلما تتضاعف الخلايا اللمفيةB، فستكون النتيجة تنوعا من الجينات بأعداد كبيرة.

كان كوهلر ومليشتين يحاولان تحديد الدور،إن وجد،الذى تلعبه الطفرات الجينية فى إنتاج الأجسام المضادة المختلفة. وفى بادئ الأمر ،كانا يرغبان فى سلالة من الخلايا يمكنها أن تنمو فى المزرعة،وتنتج نوعا واحدا من جزيء الجسم المضاد استجابة لمستضد معروف. ولم يكن شيئا من هذا القبيل متاحا فى ذلك الوقت، حيث لا يمكن الاحتفاظ بالخلايا الطبيعية المنتجة للجسم المضاد فى المزرعة لأكثر من بضعة أيام .

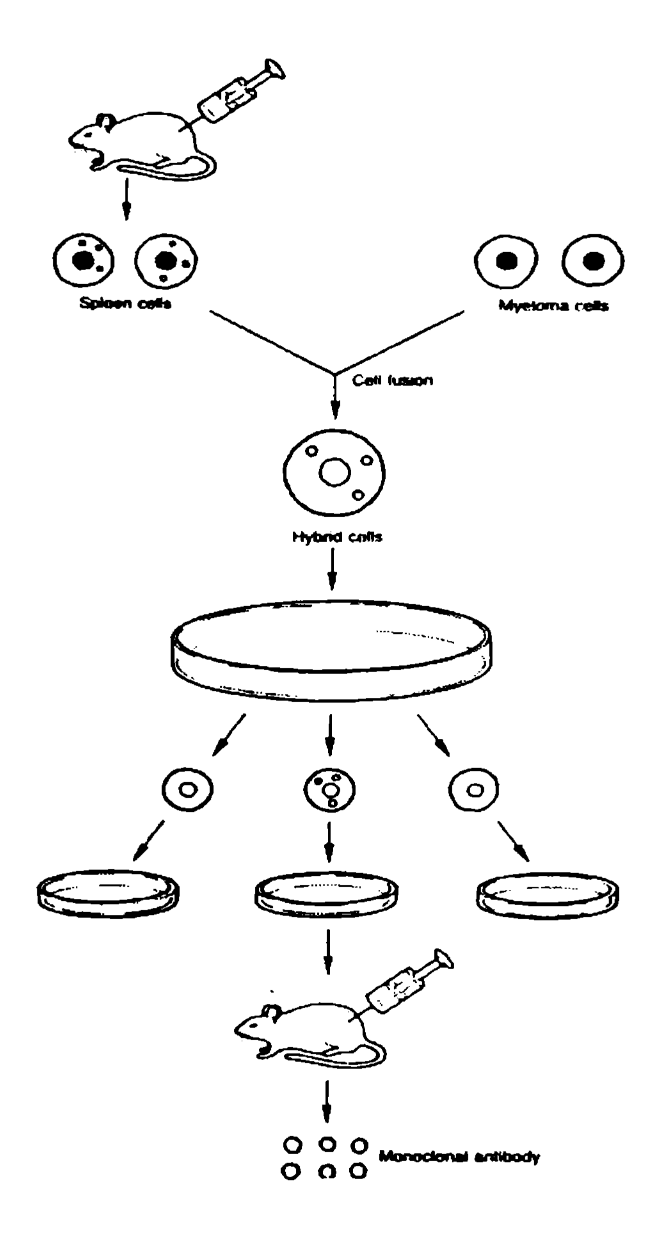
وكانت الأجسام المضادة تنتج بصورة طبيعية عن طريق حقن مستضد فى جسم حيوان وجمع الأجسام المضادة الناتجة من دم الحيوان. ويستخرج هذا الحقن خليطا متغيرا"متعدد الاستنساخ" من جزيئات أجسام مضادة مختلفة، على الرغم من أنها تتعرف جميعا على المستضد الذى استثارها.

وطرأت على بال كوهلر وميلشتين فكرة دمج الخلايا المنتجة للجسم المضاد مع خلايا من الأورام السرطانية تعرف بـــــالأورام النخاعية myelomas. وقبل ذلك بسنوات عديدة، استحث مايكل بوترMichael Potter من المعهـــد القـــومى للسرطانNational Cancer Institute فى بتسدا بولاية مريلاند سلسلة من هـــذه الأورام،التى استمدت من الخلايا المنتجة للأجسام المضادة فى الفئران. والخلايا من أورام نخاعية معينة هى خلايا استنساخية،أى أنها تنحدر جميعا مـــن نفـــس الخلية الأب الأصلية،وتفرز جميعها نفس النوع من جزيء الجسم المضاد. ومع ذلك،فقد كانت غالبية المستضدات التى تعرفت عليها الأجسام المضادة لـــلأورام النخاعية غير معروفة،وكانت محاولة التعرف على المستضد المناسب من عـــدد كبير جدا من الاحتمالات أمرا صعبا،هو أقل ما يقال .

بيد أن خلايا الأورام النخاعية يمكن حثها على النمو فى مزرعة،وفكر كوهلر وميلشتين أنه إذا أمكنهما إدماج خلايا الأورام النخاعية مع خلايا أخرى منتجـــة للأجسام المضادة لها تخصص معروف،فقد يتمكنا من الحصول علـــى ســـلالة دائمة من الخلايا تنتج الجسم المضاد الذى يحتاجون إليـــه. وللحصـــول علـــى خلايا منتجة للأجسام المضادة لها تخصص معروف،قام كوهلر بحقن الفئـــران بخلايا دم حمراء حصلا عليها من خروف،وتعتبر شديدة المستضـــدية ،وجمعـــا الخلايا اللمفيةB من طحال الحيوان ثم دمجا خلاياB مع خلايا الأورام النخاعية. وعندما استنسخت الخلايا المهجنة الناتجة،ظهر أن بعض المستنســـخات تنـــتج أجساما مضـــادة تتعـــرف بصـــورة محـــددة علـــى خلايـــا الـــدم الحمـــراء للخروف(شكل١٢-١).

وتنتج كل هجن المستنسخ الواحد نفس جزيئات الجسم المضاد-ومن ثم جاء اسم الجسم المضاد أحادى الاستنساخ. وأصبحت تعرف خلايا الهجين بأورام الهجينhybridomas. وعلى الرغم من أن أورام الهجين الأصلية التى صنعها كوهلر وميلشتين أنتجت جسمين مضادين، أحدهما من خلية الورم النخاعى والأخرى من خلية طحال التى أدمجت معها خلية الورم النخاعى،إلا أن الباحثين يستخدمون حاليا خلايا الورم النخاعى التى لا تنتج أية أجساما مضادة بنفسها،بحيث أن المنتج الوحيد لمستنسخ ورم الهجين هو الجسم المضاد من خلية الطحال.

ويمكن الاحتفاظ بمستنسخ خلية ورم الهجين بصورة غير محددة فى المزرعة،وبذلك جعل بحث كوهلر وميلشتين من الممكن إنتاج كميات كبيرة غير محدودة من الأجسام المضادة النقية ذات تخصص معروف. وبالرغم من أن الباحثين قد صرفا بحثهما لمسألة علمية بحتة،فمن المؤكد أنهما كانا يدركان أبعاد اكتشافهما. وعندما بعث كوهلر وميلشتين بنتائج بحثهما إلى مجلةNature الصادرة فى السابع من أغسطس عام ١٩٧٥،ذيلا بحثهما بالحديث عن الهجن :"أن هذه الخلايا يمكن زراعتها فى المعمل فى مزارع ضخمة لتوفير جسما مضادا محدد . ويمكن الاستفادة من هذه الخلايا فى الاستخدام الطبى والصناعى". ذلك التنبؤ الذى يؤيد بما لا يدعو للشك نتائج أبحاثهما. ولهذا الإنجاز العظيم،نال كوهلر وميلشتين جائزة نوبل عام ١٩٨٤ فى الفسيولوجيا أو الطب،اللذان شاركهما فيها نيلز جرنNiels Jerne من معهد بازل للمناعة بسويسرا،الذى قام بإسهامات نظرية كبيرة فى أبحاث المناعة.



شكل١٢-١ إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. يتم حقن فأر بأى مستضد مرغوب للحث على إنتـــاج الجسم المضاد.

بعد ذلك تجمع الخلايا المنتجة للأجسام المضادة من طحال الحيوان وتـــدمج مع خلايا الورم النخاعى للفأر لتكوين الخلايا الهجين،التى تنمو فى المزرعة. ثم تنمو بعد ذلك هجن فردية فى مزرعة لتكوين مستنسخات يتم اختبارها من أجل إنتاج الجسم المضاد الذى يتفاعل مع المستضد الأصلى. وقد تحقن بعـــد ذلـــك خلايا من المستنسخات التى تنتج الجسم المضاد فى الجوف الصفاقي peritoneal cavity لفأر آخر،حيث تكون ورما،الورم الهجين. وتفرز الخلايا الورمية للجسم المضاد فى السائل الذى يتجمع فى التجويف البطنى. ويجمع الجسم المضـــاد أحادى الاستنساخ من هذا السائل. ويمكن تجميد بعـــض الخلايـــا المستنســـخة المنتجة للجسم المضاد أحادى الاستنساخ أيضا،لاستخدامها فى المستقبل.

تطبيقـــات الأجســـام المضـــادة أحاديـــة الاستنســـاخ

Applications of monoclonal antibodies

لقد تبين بالدليل القاطع أن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ علـــى درجـــة كبيرة من النفع للأبحاث المناعية والجزيئية. ومن جملة استخداماتها العديدة عزل البروتينات،وتظهر فائدتها كذلك فى استنساخ الجين. ومن إحـــدى المشـــكلات الغاية فى الصعوبة لاستنساخ الجين هى التعرف على الخلايا التى تحتوى على الجين المرغوب. فإذا توفر جسم مضاد أحادى الاستنساخ يتعرف على المنـــتج الجينى ،فيمكن استخدامه كمجس للكشف عن تلك الخلايا التى تصنع المنتج ومن ثم تحتوى على الجين.

بالإضافة إلى ذلك، أسهمت الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ إسهاما عظيما فى تحديد الأنواع العديدة المختلفة من الخلايا التى تشـــارك فـــى الاســـتجابات

المناعية،وفى توضيح تفاعلاتها. ويحتوى الجهاز المناعى بالإضافة إلى الخلايا Bعلى نوع رئيسى آخر من الخلايا اللمفية يعرف بالخلاياT. ففى حين أن من بين وظائف خلايا B الرئيسية إنتاج الأجسام المضادة،فلخلايا T بضعة وظائف مختلفة. فالبعض منها خلايا فتاكة يمكنها أن تهاجم مباشرة الخلايا التى تكتشف أنها غريبة. وتشمل هذه الخلايا الغريبة على الخلايا المصابة بالفيروس ولعلها الخلايا السرطانية. وتعتبر الخلايا اللمفيةT منظمات مهمة أيضا للاستجابات المناعية، ومن جملتها إنتاج الأجسام المضادة التى تصنعها الخلايا B. وتشمل الخلاياT المنظمة على المساعداتhelpers والتى كما يوحى اسمها،تعمل على تنشيط الاستجابات المناعية،كما تشمل الكابحاتsuppressors ذات التأثيرات الكابحة.

وأثبت استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أن الأنواع العديدة من خلاياT تحمل مستضدات أو علامات على سطوحها،تسمح بأن يميز نوع من نوع آخر. وقد ساعدت الأجسام المضادة أيضا فى تحديد التغيرات التى مرت بها الخلايا B والخلاياT أثناء تطورها.

كبح الاستجابات المناعية

Suppressing immune responses

وإحدى ثمرات البحث فى علامات الخليةT،هى تطوير الجسم المضاد أحادى الاستنساخ الذى يجرى استخدامه حاليا فى منع رفض الكلى المنقولـــة . فهـــذا الجسم المضاد الذى يباع فى السوق حاليا تحت اسمOrthoclone OKT-٣،يتفاعل بشكل محدد مع المستضد "OKT-٣"، الموجود على كل خلايا T.

ولمنع رفض النسيج الغريب،يتناول مرضى زرع الكلـــى بصـــورة دوريـــة عقاقير لكبح أنشطة أجهزتهم المناعية. وعلى الـــرغم مـــن ذلك،فـــإن حـــوالى ٦٠%من جملة٧٠٠٠ مريضا، الذين يقومون بعمليات زرع كلى كل عـــام فـــى الولايات المتحدة يواجهون أعراض تهدد بفقدهم للعضو المنزرع (الكلى).

ويحدث رفض الجزء المنزرع أساسا من خلال تدخل خلاياT . وبالتالى فإن الجسم المضاد OrthocloneOKT-٣ يمنع هجوم الخلايا التى تسبب الرفض. وفى تجربة إكلينيكية قومية،أنقذ الجسم المضاد ٩٠% من كلى المرضى الذين كانـــت تنتابهم أعراض رفض العضو المنزرع. وبالمقارنة، وجد أن العلاج بالعقـــاقير الكابحة للمناعة له فقط نسبة نجاح ٧٥% من الحالات.

والجسم المضاد أحادى الاستنساخ،ليس فقط أكثر فاعلية عن العقاقير فى منع رفض الكلى،لكنه قد يكون أيضا أقل قابلية لإحداث تأثيرات جانبيـــة. فالجســـم المضاد لا يكبح إلا خلايا T ، فى حين تكبح العقاقير التى من جملتها المضـــاد الحيويcyclosporin وبعض السترويدات جميع الأوجه الوظيفية المناعية،ونتيجة لذلك تترك المرضى أكثر عرضة للأمراض المعدية. بالإضافة إلـــى ذلك،قـــد

تحدث العقاقير أضرارا مستديمة للكلــى. بيــد أن الجســم المضـــاد الأحـــادى الاستنساخ لا يخلو من التأثيرات الجانبية التى يسببها . فيمكنه أن يسبب الحمى، والقشعريرة ،والغثيان، والقيء، وقصر التنفس، وآلام الصدر، على الرغم من أن هذه التأثيرات يمكن أن تتكرر .

وهناك أمراض بشرية عديدة يسببها هجوم ظاهرى للجهاز المنـــاعى علـــى أنسجة الجسم. وتشمل حالات المناعة الذاتية autoimmuneهـــذه علـــى الــوهن العضلى الوخيم myasthaenia gravis ، الذى يتصف بالضعف العضلى المتطور الناتج عن تدمير أنواع معينة من الخلايا العصـــبية،والالتهاب الجلـدى الــذئبى الشاملsystemic lupus erythematosus،الذى يمكن أن يصيب بعض أعضـــاء الجسم المهمة مثل، الرئتان والكلى أو المخ بالهجوم المناعى، وإمكانية تصـــلب الأنسجة المضاعفmultiple sclerosis،الذى يصاحبه تدهور متطـــور للجهـــاز العصبى المركزيcentral nervous system.

ويحاول الباحثون تحديد ما إذا كان من الممكن استخدام الأجســـام المضـــادة أحادية الاستنساخ،التى توجه ضد مكونات الخلية المناعية التى قد تكون متضمنة فى إثارة الاستجابات المناعية الشاذة، فى علاج حالات المناعة الذاتية. وعلـــى سبيل المثال،وجد الباحثون فى مدرسة طب التابعة لجامعة ستانفورد فى بالو ألتو بولاية كاليفورنيا،أنه يمكن لهذه الأجسام المضادة أن تكبح تطور حالات مماثلـــة فى الفئران،مثل الالتهاب الجلدى الذئبى الشامل وتصلب الأنســجة المضـــاعف والوهن العضلى الوخيم الموجودة فى البشر.ولا يزال هذا البحث فـــى مراحلـــه الأولى،لكنه يعطى على الأقل بداية مشجعة لما قد تصبح فى النهايـــة صـــورة جديدة من صور علاج المناعة الذاتية.

تشخيــص الأمــراض المعــدية

Diagnosis of infectious diseases

تعتبر تطبيقات التشخيص للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ تطبيقات متقدمة إلى حد بعيد،خصوصا فى الاختبارات التى تجرى علــى ســوائل الجســم،مثل عينات الدم والبول. وقد خصص من أجل تتبع الحمل حوالى الثلث من المائــة وخمسين جسم مضاد أحادى الاستنساخ التشخيصى التى وافقــت عليهــا هيئــة الأغذية والدواء الأمريكية . ويحتوى بول النساء الحوامل على هرمون يســمى المنشط المنسلى المشيمى البشــرىhuman chorionic gonadotrophin، الــذى تفرزه المشيمةplacenta. ويتيح استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى الهرمونات حاليا تشخيص الحمل مبكرا لفترة تصل لأسبوع أو أسبوعان بعــد الحمل conception.

ويجرى حاليا أيضا تحسين تشخيص الأمراض التناســلية venereal diseases من خلال توفر الحصول على الأجسام المضادة أحادية الاستنســاخ. فمــرض السيلانGonorrhorea،الــذى تســببه الإصــابة ببكتيريــا نيســيريا الســيلان المنويNeisseria gonorrhoeae والعدوى المتــدثرة chlamydia،التــى يســببها الطفيل الضمنخلوى من الحراشف البرعمية Chlamydia trachomatis،يعتبــران من بين الأمراض التناسلية الخطيرة. وهناك حوالى اثنان مليون حالــة مــرض سيلان gonorrhoea فى الولايات المتحدة كل عام،وربما تصل حالات الإصــابة بالمتدثرةChlamydia حوالى من ٥ إلى ١٠ مليون حالة فى الولايات المتحــدة. وعلاوة على ذلك،فكلتا العدويين يمكن أن تسببا مرض التهاب الحــوض pelvic

inflammatory disease،وبذلك تعتبران أحد الأسباب الرئيسية لعقم النساء. وتتطلب الحالتين طرق علاج مختلفة،لكنه يصعب التمييز بينهما على أساس أعراضهما التى تعتبر متشابهة تماما فى السابق .

وكانت تتطلب الطريقة الأكثر دقة لتشخيص السيلان فى النساء أن يجرى استزراع البكتيريا المسبب للعدوى،وهو إجراء يحتاج من يومين إلى ثلاثة أيام. وكان التشخيص المحدد لعدوى المتدثرة من التشخيصات الصعبة جدا، لأن المتدثرة لا تنمو إلا بين الخلايا الحية،وكان يتطلب إتمام إجراء الاختبار مدة تصل من يومين لسبعة أيام. وقد استطاعت طرق الاختبار الجديدة التى تستخدم الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أن تقلل بدرجة كبيرة الوقت المطلوب لتشخيص هذين المرضين التناسليين. وعلى سبيل المثال، أنتج روبرت نوينسكي Robert Nowinski وزملاؤه فى مؤسسة النظم الوراثية و مدرسة الطب فى جامعة واشنطن فى سيتل بواشنطن،أجساما مضادة أحادية الاستنساخ، يمكنها التعرف على نيسريا السيلان المنوى أو الحراشف البرعميةC.trachomatis فى غضون ١٥ إلى ٢٠ دقيقة، وسمحت بالتالى يتم العلاج السليم بسرعة أكبر مما كان فى يحدث الماضى.

وطور باحثو سيتل أيضا أجساما مضادة أحادية الاستنساخ يمكنها التمييز بين فيروسات وثيقة الصلة ببعضها، مثل فيروس القوباء١وفيروس القوباء٢(HSV١وHV٢). ويمكن أن يسبب كلا هذين الفيروسين أعراضا التهابية ارتجاعية مؤلمة. فعادة يصيب فيروس القوباء١ منطقة الفم،ويحدث بها القروح الباردة المعروفة،ويصيب فيروس قوباء ٢ أساسا المناطق التناسلية،فى حين لا

يكون هذا الاختلاف فى تفضيل موقع الإصابة مطلقا. فحوالى من ١٥ إلى ٢٠ % من العدوى التناسلية يسببها فيروس قوباء١.

ويعتبر تحديد الفيروس المعين أمرا مهما،لأن الآلام التى يسببها فيروس قوباء١ فى المناطق التناسلية،أقل تكرارا من الآلام التى يسببها فيروس قوباء٢،ولأن العقاقير الخاصة المضادة للفيروس قد تكون أكثر فاعلية ضد أحد الفيروسين عن الفيروس الآخر. ويمكن الكشف عن الفيروسات من خلال قدرتها على الفتك بالخلايا المستزرعة، غير أن هذا الاختبار يتطلب مدة حوالى من ٣ إلى ٦ أيام. بعد ذلك هناك اختبارات إضافية مطلوبة لتصنيف الفيروس المكتشف إما فيروس قوباء١ أو٢. وتستطيع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ تشخيص عدوى فيروس القوباءherpes virus infections وتحديد نوع الفيروس بصورة مباشرة من العينات الإكلينيكية التى يتم الحصول عليها من خلال كشط الخلايا من الآفات. ويقلل هذا مرة أخرى من زمن التشخيص لمدة تتراوح ما بين ١٥ إلى ٢٠ دقيقة.

تشخيص السرطان

Cancer diagnosis

وقد نتج عن توفر الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ التى تتعرف على مستضدات الخلية المناعية تحسنا فى تشخيص أمراض سرطان الدم والأورام اللمفية،وهى سرطانات الخلايا T وB،اللتان يصعب أحيانا التمييز بينهما. وعلى الرغم من ذلك،فقد يكون التكهن بسرطانات الخلية المناعية مختلفا تماما. فالبعض منها أكثر استجابة للعلاج عن الأخريات ، وتتوقف حياة المرضى على

التشخيص الدقيق والمبكر والبدء السريع بالعلاج المناسب لسرطان الخلية المناعى المعين. والأجسام المضادة أحادية الاستنساخ،التى تتعرف على العديد من علامات الخلايا المناعية البشرية،والتى طور العديد منها ستيورات سكلوسمانStuart Schlossman وزملاؤه فى معهد هارفارد دانا –فاربر للسرطان فى مدينة بوسطن بولاية ماساشوتس،قد وفرت وسيلة لتمييز نوع الخلية المحدد الذى يسبب خلية سرطانية مناعية،وبذلك يتحدد بدقة النوع المعين من سرطان الدم أو الورم اللمفى.

ويجرى أيضا تطبيق التخصصات الدقيقة للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى تشخيص الأورام الصلبة،وخاصة السرطانية منها وتشمل الأورام السرطانية سرطانات الرئة والثدى والقولون والمستقيم،التى تعتبر من أكثر أنواع السرطان شيوعا فى الدول المتقدمة. ويمكن للجراحة التى تقوم باستئصال هذه الأورام الأولية أن تعالج هذه السرطانات،ولكن إذا استشرت إلى أنسجة أخرى فلا يمكن حاليا سوى القيام بالقليل جدا للتخلص من الورم المنبثmetastatic disease(أى الورم الذى يستشرى من موقعه إلى مواقع أخرى بالجسم) وينعقد الأمل فى أن يتيح التخصص الدقيق للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ الاكتشاف المبكر لكلا من الأورام الأولية والأورام السرطانية الارتجاعية عما هو ممكن حاليا،وربما يؤدى إلى معدلات شفاء أفضل.

وفى الاختبارات الأكثر تقدما فى الأورام الصلبة يجرى استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى فحص عينات الدم أو البصاق أو فحص جزء من النسيج الحى مجهريا،أو فحص المواد التى أفرزتها الخلايا السرطانية. وحتى الآن ومنذ عدة سنوات، راقب أساتذة الطب حالات المرضى الذين يعالجون من

سرطانات القولون والمستقيم والسرطانات الأخرى، من خلال تحديد تركيـــزات المستضد السرطانى الجنينى(CEA) فى دمـــائهم . وتفـــرز هـــذه الســـرطانات المستضد السرطانى الجنينى فى الدم، على الرغم من أن وجوده هناك لا يعتبر محددا معينا على الإطلاق لوجود الورم الخبيث. فهو ينتجه أيضا علـــى ســـبيل المثال، النسيج الجنينى العاديnormal embryonic tissue.

وعلى الرغم من ذلك ،فقد ظهرت فاعلية المستضد السرطانى الجنينى كمحدد تكهنى للسرطان، حيث تكون تركيزاته عالية فى مصل الدم فى المرضى غيـــر المعالجين،وتميل تركيزاته للهبوط بعد إجراء جراحة ناجحـــة. وتعتبـــر عـــودة الأورام مؤشرا لزيادة كميات المستضد السرطانى الجنينى فى الدم. وقد حددت فى البداية تركيزات المستضد عن طريق مستحضرات الجسم المضـــاد متعـــدد الاستنساخ العادى،لكنه يجرى استبدال هذه المستحضرات حاليـــا بعـــدة أنـــواع مختلفة أحادية الاستنساخ،والتى تعتبر من الكواشف الأكثر حساسية.

وقد وجه قدر كبير من البحث خلال السنوات العديدة الماضية نحـــو تمييـــز الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ التى تتعرف على مستضـــدات مخصصـــة لأنواع معينة من الأورام- أورام الثدى أو الرئة على ســـبيل المثـــال. ويمكـــن استخدام هذه الأجسام المضادة بصورة علاجية أو تشخيصية. وتوصل الباحثون الذين أجروا البحث إلى نقطة اتفاق بصفة عامة على أن هذه الخلايا الورمية لا يحتمل أن تنتج مستضدات علامية،التى تعتبر مخصصة بصورة مطلقة لنوع من معين من السرطان. وتبعا لزينون ستلويســـكيZenon Steplewski مـــن معهـــد ويستار فى فيلاديفيا بولاية بنسلفانيا،أنه يمكن أن يوجد دائما مستضـــد ورمـــى

ظاهر على خلايا طبيعية أخرى،إذا ما أمعن الباحث بنظرته الفاحصـــة بقـــدر كاف.

وعلى الرغم من أنه قد لا يكون هناك شـــيئا مثـــل، مستضـــدات " محـــددة للورم"،إلا أن الباحثين استطاعوا تحديد أجساما مضادة أحادية الاستنساخ تتعرف على المستضدات "المصاحبة للورم"،توجد فـــى أنـــواع معينـــة مـــن الخلايـــا الورمية،لكنها نادرا ما توجد فى الخلايا الطبيعية . وهذه الأجسام المضادة محددة بشكل كاف للخلايا الورمية لكى يمكن استخدامها فى تشخيص السرطان.

وعلـــى ســـبيل المثال،فـــإن ستبلويســـكى الـــذى عمـــل مـــع هـــيلارى كوبرويسكيHilary Koprowski التى هى أيضا من معهد ويســـتار،أنتج جســـما مضادا أحادى الاستنساخ يتفاعل مع مستضـــد صـــنعته ســـرطانات القولـــون والمستقيم، وبواسطة بضعة مسرطنات أخرى فى المعدة والأمعـــاء،والتى مـــن جملتها سرطانات البنكرياس والكبد والمعدة.

وفى دراسة موسعة على مئات المرضى،الذين يعالجون من سرطان القولون والمستقيم،وجدت مجموعة ويستار أن الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ يمكـــن أن يتنبأ برجوع السرطان فى بعض المرضى. فتركيز مصل المستضـــد الـــذى اكتشفه الجسم المضاد،أصبح مرتفعا لمدة من ٣ إلى ١٨ شهرا قبل أن تصـــبح الأورام الارتجاعية ظاهرة إكلينيكية .

وقد استطاع روبرت باستRobert Bast وزملاؤه فى المركز الطبى بجامعة الدوق فى درهام فى نورث كارولينا،أن يحددوا جسما مضادا آخر،أعطى أمـــلا فى تشخيص السرطان،وفى هذه الحالة سرطانات المبـــيض ovarian cancers.

ووجد باحثو الدوق أن تركيز الدم فى المستضد الذى اكتشفه الجسم المضاد قد ارتفع فى أكثر من ٨٠% فى مرضى سرطان المبيض،لكنه يرتفع ١% فقط فى الأشخاص العاديين. وتوضح هذه النتائج أيضا أنه يمكن استخدام الجسم المضاد أحادى الاستنساخ فى مراقبة استجابة المرضى للعلاج.

وتحدث سنويا أكثر من ١٢٠٠٠٠ حالة سرطان رئة فى الولايات المتحدة،و٩٠% من الأشخاص الذين يصابون بسرطان الرئة يموتون بسبب المرض،الذى ينتشر بشكل متكرر قبل اكتشافه. وكان جون مينا John Minna وزملاؤه فى معهد السرطان القوميNCI فى بتسدا بولاسة مريلاند،يعملون فى إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ التى قد تساعد على تشخيص سرطانات الرئة.

هناك أربعة أنواع من سرطانات الرئة. ويتطلب أحد هذه السرطانات الأربعة- سرطان الخلية الصغيرة الرئوى (SCLC)- أسلوبا علاجيا مختلفا عن أورام الرئة السرطانية الأخرى. ولما كان سرطان الخلية الصغيرة الرئوى ينبث بصورة مبكرة جدا خلال دور المرض،فلا يمكن إخضاعه للجراحة،لكنه غالبا ما يستجيب لفترة على الأقل للعلاج الكيماوى . ولا تستجيب أورام الرئة السرطانية الأخرى للعلاج الكيماوى ،لكنها يمكن أن تعالج بالجراحة إذا أمكن اكتشافها قبل أن تنتشر.

وأنتج ميناMinna وزملاؤه فى معهد السرطان القومى، جيمس ملشاين James Mulshineوفرانك كيتيتاFrank Cuttitta، جسمين مضادين أحاديا الاستنساخ اللذان يتعرفان على أكثر من٩٠% من سرطانات غير سرطانات الخلية

الصغيرة الرئوية ،لكنهما لا يرتبطان إلا بحوالى ٢٠% من سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية. وطور أيضا جيفرى سكلومJeffery Schlom من المعهد القومى للسرطان، ووليام جونستونWilliam Johnston من المركز الطبى بجامعة الدوق وزملاؤهما، جسما مضادا أحادى الاستنساخ يتفاعل مع الخلايا من غير سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية. وقد تفيد هذه الأجسام المضادة فى تمييز سرطان الخلية الصغيرة الرئوى عن صور سرطان الرئة الأخرى.

وتقع السوائل الغشائية الجنينيةPleural effusions،التى تعتبر سوائل شاذة، داخل الرئة وحولها ،ويمكن أن تحدث سوائل الاستسقاء البطنى ascites fluids التى تقع فى التجويف البطنيabdominal cavity،إما بسبب العدوى، أو بسبب الأورام الخبيثة،خاصة تلك الأورام التى تنشأ فى الثدى أو فى الجهاز التناسلى الأنثويfemale genital tract. ويعد التعرف على الخلايا السرطانية فى السوائل الغشائية الجنينية أو فى سوائل الاستسقاء البطنى من الأمور الصعبة،ولكن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ قد تساعد فى هذا المضمار أيضا.

استطاع سكلومSchlom وجونستونJohnston وزملاؤهما،أن يحددوا جسما مضاد أحادى الاستنساخ،يتفاعل مع خلايا أنواع عديدة من السرطانات،التى من جملتها سرطانات الثدى والرئة والمبايض. وتدل الدراسة المبكرة للجسم المضاد على أنه يكتشف بشكل مؤكد الخلايا السرطانية فى كل من سوائل الاستسقاء البطنى والسوائل الغشائية الجنينية . ويمكن أن يساعد أيضا فى تمييز الخلايا السرطانية فى عينات خزعة يتم الحصول عليها بسحب مادة من الأورام الخبيثة المشكوك فيها،أورام الثدى، على سبيل المثال،بواسطة إبرة وحقنة (شكل ١٢-٢).

وطرق استخدام الأجسام المضادة فى الكشف عن الأورام السرطانية بطريقة مباشرة فى المرضى، تعد أقل تطورا بدرجة كبيرة عن نظم تحليل عينات الــدم والعينات الأخرى التى تسحب من الجسم. وتزود الأجســام المضــادة أحاديــة الاستنساخ المستخدمة للتصوير فى الجسم الحى بمادة إشعاعية وتحقن فى مجرى الدم أو أى مكان آخر فى الجسم. والفكرة هى أن تخصصية الجســم المضــاد ستمكنه من البحث عن أى خلايا سرطانية والارتباط بها وتحمل مستضد مناسب، ،وتركز النشاط الإشعاعى بالتالى فى مواقع الأورام. والطرق السريرية لتحديــد تمركز الكاشفات الإشعاعية فى الجسم متوفرة إلى حد كبير،على الرغم من أنها لم تصمم فى الأصل كى تستخدم مع الأجسام المضادة الموسومة بالإشعاع .

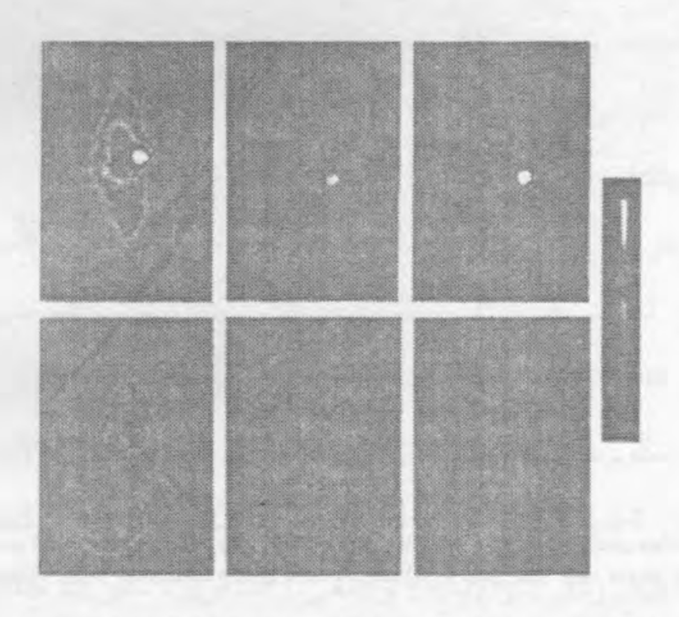
كانت النتائج التجارب الأولية للتصوير داخل الجسم الحى نتــائج إيجابيــة. وأوضحت مجموعات عديدة أن الأجسام المضادة الموسومة بالإشعاع تتركز فى الأورام على الرغم من مزيد من البحث لا يزال مطلوبا قبل استخدام هذه الطرق التصويرية بشكل روتينى فى العيــادة (شــكل ١٢-٣و١٢-٤). وقــد وســمت الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى معظم هذا البحث بــاليود-١٣١،وفــى الغالب لأن هذا النظير المشع يعتبر غير مكلف،وقد حصل الباحثون على قــدر كبير من الخبرة من خلاله إلحاقه بالبروتينات. وعلاوة على ذلك، فــإن إرفــاق النظير المشع مع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ قــد يكــون مفيــدا فــى العلاج،لأنه يبعث إشعاعا عالى الطاقة.

وعلى الرغم من ذلك، لا يعتبر يود-١٣١ مثاليا فى التصوير التشخيصــى، حيث تميل بعض الأجسام المضادة إلى الــتخلص منــه،ولا تســتطيع أجهــزة التصوير الحالية أن تكتشفه بطريقة فعالة. ولهذا السبب ،بدأ الباحثون فى تطوير

طرق لوسم الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ بنظائر مشعة تعتبر أكثر ملاءمة للتصوير.

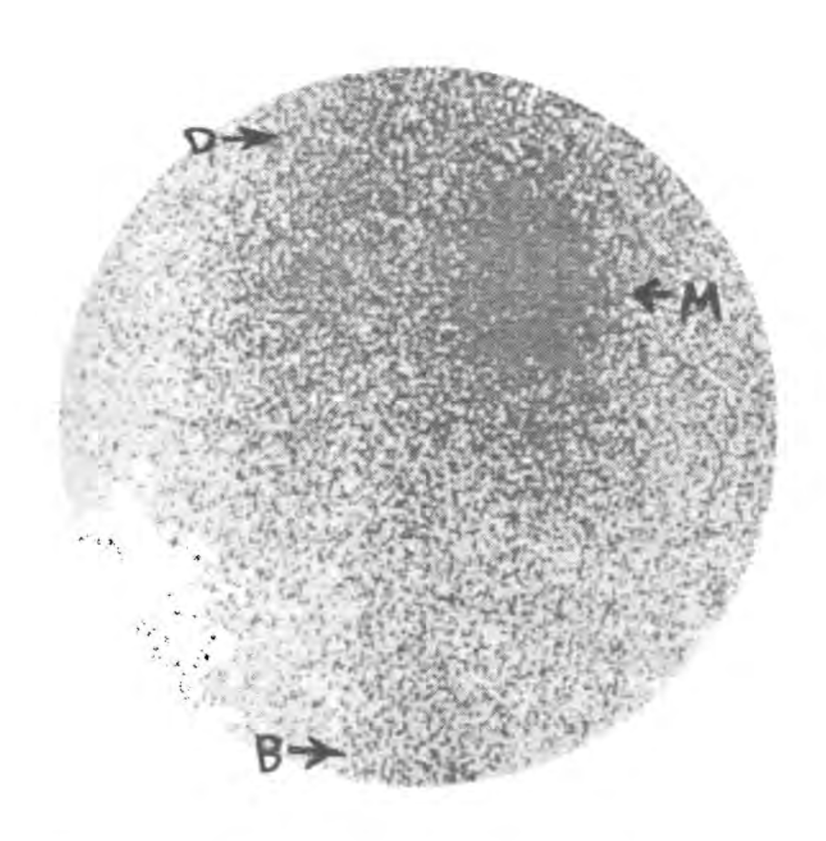


شكل ١٢-٢ خلايا السوائل الغشائية الجنينية مشدودة بجسم مضاد أحادى الاستنساخ يتعرف على الخلايا السرطانية. وتم الحصول على الخلايا من مريض كان يشك فى أنه مصاب بسرطان الصدر. وتوضح بعض الخلايا المصطبغة باللون البنى المحمر أنها تفاعلت مع جسما مضادا أحادى الاستنساخ وبذلك تعتبر خلايا أورام سرطانية.



شكل ١٢-٣ استخدام جسم مضاد أحادى الاستنساخ فى تحديد الخلايا السرطانية البشرية التى استزرعت فى الفئران.

و يتعرف الجسم المضاد الموسوم بمادة اليود المشعة على مستضد موجود في خلايا القولون، ولا يوجد في خلايا ورم النخاع. وتركيز الجسم المضاد على ورم القولون يمكن الكشف عنه خلال اليوم الأول من الحقن. ولا تزال هناك ثلاثة أيام بعد الحقن عندما يشاهد نشاطا إشعاعا أقل في الدم . ولا يتركز الجسم المضاد في ورم النخاع.



شكل ١٢-٤ الكشف عن السرطان المنبث في كبد مريض. ويشمل هذا المنظر للفحص بأشعة جاما على البطن كلها بدءا من الحجاب الحاجز(D) إلى المثانة(B). ويتركز الجسم المضاد الموسوم بالإشعاع في الكبد(M)و بالتالي يظهر وجود السرطان في هذا العضو.

عــلاج الســرطان

Cancer therapy

وقد تستخدم الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى النهاية ،ليس مجرد فـــى الكشف عن الخلايا السرطانية ولكن فى إبادتها .وينعقد الأمل علـــى الأجســام المضادة لما لها من تخصص، فى أن تكون تأثيراتها الجانبية الضارة أقل مــن طرق العلاج الأكثر تقليدية التى يستخدم فيها العقاقير والإشعاع،والتى غالبا مــا تتلف الخلايا الطبيعية وكذلك الخلايا السرطانية. ومع ذلك، لا يحتمل أن يكــون تخصص الأجسام المضادة مطلقا،لأن المستضدات التى تتعرف عليها لا تقتصر فقط على الخلايا الورمية.

وقد بدأ الباحثون فى بعض المراكز الطبية قبل ذلك بمحــاولات إكلينيكيــة للعلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. وكمـــا هـــى الحالـــة عــادة فـــى المحاولات الأولى لأى علاج تجريبى،فقد كان كل المرضى فى هذه الدراســات من الذين يعانون من أنواع سرطان متقدم لم تستجب لأنواع العــلاج التقليديــة. وعلى الرغم من هذا برزت نتيجتان واعدتان : وهى أن الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أحدثت على الأقل خمودا جزئيا للورم فى بعض المرضى، وتحمــل الأشخاص الذين العلاج بالأجسام المضادة بصورة طبيعية.

ووفقا لسكلوم،فإن عدة مئات من الأشخاص قد عولجوا حتى الآن فى العديــد من المراكز الطبية،وكانت التأثيرات الجانبية للعــلاج بالجســم المضــاد،والتى اشتملت الغثيان والقيء والإسهال والحمى والقشعريرة تأثيرات جانبية معتدلـــة، ولم يتوفى أى من المرضى الذين كانت حالتهم خطيرة جــدا بســبب العـــلاج

التجريبى. وأظهرت الخبرة الطويلة فى التجارب الإكلينيكية أن العوامل العلاجية الجديدة الفعالة قد تسبب وفيات عرضية،عندما يتم اختبارهـا فـى المرضـى الموهنين نتيجة لتقدم المرض،لكن هذا لم يحدث حتى الآن مع العلاج بالأجسـام المضادة أحادية الاستنساخ.

ويجرى استكشاف بعض الاستراتيجيات للاستخدام العلاجى للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ من خلال الدراسات. وفى البعض منها اسـتخدمت الأجسـام المضادة المجردة. ويعتمد تدمير الخلايا الورمية حينئذ على قدرة الجسم المضاد على الارتباط بالخلايا، وإحداث آليات الفتك الطبيعية فى الجهاز المناعى. وفى إحدى هذه المحاولات، قام هنرى سيرز Henry Sears من المركز الطبى فوكس شيز Fox Chase Cancer Centre فى فيلاديفيا بإعطـاء جسـم مضـاد أحـادى الاستنساخ ضد سرطان القولون والمستقيم،الذى صنعته مجموعة كوبرويسكى-ستبلويسكى، لمرضى سرطان البنكرياس أو القولون والمستقيم، ولوحظ انحسار الورم فى بعض المرضى.

وهناك طريقة أخرى لاستخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى علاج السرطان،وذلك عن طريق إقران الأجسام المضادة بالعقاقير القاتلـة للخليـة أو بسموم أو نظائر مشعة. ويستخدم الجسم المضاد فى تلك الحالة فى تركيز العامل القاتل فى الورم،بينما لا تتعرض الخلايا الطبيعية كثيرا للإشعاع. وعلى سـبيل المثال،بدأ رالف ريسفيلد Ralph Reisfeld وزملاؤه فى عيادة سكربس ومؤسسـة الأبحاث فى لا جولا فى كاليفورنيا محاولة تجريبية مع مرضى سرطان الرئـة بواسطة جسم مضاد أحادى الاستنساخ الذى تم ربطه بالعقار العلاجى الكيماوى الـــ methotrexate. ونتج عن ذلك أن انكمش الورم فى حـالتين مـن إحـدى

عشرة حالة من المرضى الذين داوموا على العلاج. وعلى الرغم من أنه سابق الأوان الحصول على أية نتائج قوية عن كفاءة العلاج من خلال رفـق العقـار بالجسم المضاد أحادى الاستنساخ،إلا أن العلاج به يسمح بإعطاء جرعات أكبر للمرضى عن الجرعات المعتادة من عقار الـــ methotrexate الكيماوى شديد السمية.

والخِرْوَع ricin هو بروتين بذرة نبات الخروع من البروتينات قوية السمية، حيث يمكن لجزيء واحد أن يقتل خلية. ووجدت عدة مجموعات اشتملت علـى ألين فيتيتاEllen Vitetta وجونثان أوهرJohnathan Uhr فى المدرسـة الطبيـة الجنوبية الغربية بجامعة تكساس فى دالاس وريتشارد يولRichard Youle فـى المعهـد القـومى للاضـطرابات العصـبية والاتصـالية Neurological and communicative Disorders وستروك Strokeفى بتسدا بماريلاند، إن إرفـاق الخروع مع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ يمكن أن يقتل خلايا سرطان الدم فى المزرعة وفى حيوانات التجارب.

يجب أن تدخل العقاقير والسموم إلى الخلايا إن كانـت سـتحدث تأثيراتهـا القاتلة. ومع ذلك،فيمكن للإشعاع أن يقتل خلية من خارجها،وقد يكون له نتيجـة ذلك، ميزة تفوق العوامل الأخرى عندما يوجه بواسطة الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. ولا تزال جهود جارية تبذل لتقييم الإمكانات العلاجية الفعالة لإرفاق الأجسام المضادة الأحادية الاستنساخ والنظائر المشعة فى عدة معامل مختلفـة. وقد حصل ستيفن روسن Steven Rosenمن الجامعة الشمالية الغربية فى شيكاغو بولاية ألينوى على تسكين قصير الأمد لآفات البشرة التى يسـببها ورم الخليـة اللمفيةT،فى اثنين من خمسة مرضى قام بعلاجهم بهذا الإرفاق.

بالإضافة إلى ذلك،فقد حصل ستانلى اوردرStanley Order فى مدرسة الطب بجامعة جونز هوبكنز فى بلتيمور بمريلاند على تسكين جزئى أو كامل لحوالى ٥٠إلى ١٠٠% من المرضى الذين علاجهم من سرطان الكبد بمركب من يـود إشعاعى مع جسم مضاد، على الرغم من استخدام أوردر لمستحضر من جسـم مضاد متعدد الاستنساخ بدلا من الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ.

واستطاع رونالـد ليفـيRonald Levy وريتشـارد ميللـرRichard Miller وزملاؤهما فى مدرسة الطب بجامعة ستانفورد،أن يحققوا واحدا من العلاجـات القليلة لمريض بالسرطان بواسطة العلاج بالجسم المضاد أحـادى الاستنسـاخ. واستنبط هؤلاء الباحثون استراتيجية غير عادية لعلاج الورم اللمفى للخليـةB. وكانت تشتق خلايا هذا السرطان من الخلايا المنتجة للجسم المضاد،ولذلك تحمل على سطوحها جزيئات من الجسم المضاد صنعته الخلية الأصلية. وعلاوة على ذلك،وبما أن الأورام اللمفية للخلاياB،أوراما استنساخية،فيجب أن تحمل جميـع الخلايا الورمية نفس الجسم المضاد. وقد جاءت هذه الأورام باسـتثناء الحالـة الأكثر عمومية،التى لم توجد فيها مستضدات محددة الورم بصورة مطلقة. فكل ورم لمفى للخليةB،يحمل مستضاده الورمى الوحيد،أى الجسم المضاد .

والأجسام المضادة هى بروتينات، ومثل كل البروتينات الأخرى تسـتطيع أن تستجلب إنتاج الجسم المضاد. وكانت طريقة مجموعة ليفى فى عـلاج الأورام اللمفية،هى جعل الجسم المضاد الأحادى الاستنساخ يتعرف بصورة محددة على الجسم المضاد الموجود على خلايا الورم اللمفى. وتتطلب هـذه الاسـتراتيجية بخلاف الاستراتيجيات الأخرى التى يجرى اختبارها،جسـما مضـادا أحـادى الاستنساخ مختلفا لكل مريض. وقد حدث لأول مريض عـولج بهـذا الجسـم

المضاد إخمادا كاملا للورم، وظل معافى من المرض لمدة وصلت لأكثر من خمس سنوات–والتى تعتبر الحد القياسى للشفاء من السرطان. واستمر ليفى منذ ذلك الحين فى علاج مجموعة من المرضى،لكنه لم يستطع تكرار نجاحه الأول. فقد حدث لبعض المرضى إخمادا جزئيا مؤقتا للورم،فى حين لم يكن هناك شفاء كامل.

كان يجرى الحصول على جميع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ المستخدمة حتى الآن من الفأر،ولما كانت تعتبر بروتينات غريبة،فغالبا ما كانت تبعث على تكون جسم مضاد فى المرضى. وقد تنقص الأجسام المضادة الموجودة فى المرضى من فعالية الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ العلاجية التى من مصدر الفأر،وقد يكون هذا سببا إلى حد ما فى فشل معظم استجابات مرضى ليفى للعلاج.

إلا أنه من المحتمل أن تكون المشكلة الرئيسية قد نشأت من طبيعة جينات الجسم المضاد، حيث يتكون كل جزيء من الجسم المضاد من أربعة بروتينات: سلستان ثقيلتان متماثلتان ذات وزن جزيئى ٥٠٠٠٠ لكل منهما،وسلسلتان متماثلتان خفيفتان ذات وزن جزيئى ٢٣٠٠٠ لكل منهما(شكل ١٢-٥و١٢-٦). ويمكن أن تنقسم كل سلسلة خفيفة وكل سلسلة ثقيلة إلى منطقة ثابتة constant region،وكما يوحى اسمها،تكون متماثلة فى كل السلاسل من نفس النوع،وإلى منطقة متغيرةvariable region،تختلف من سلسلة لسلسلة تالية لها. ويكون اتحاد المناطق المتغيرة من السلاسل الخفيفة والثقيلة موقعى ارتباط لمستضدين فى جزيء جسم مضاد. وتعتمد هذه القدرة لجزيئات الجسم المضاد فى التعرف على

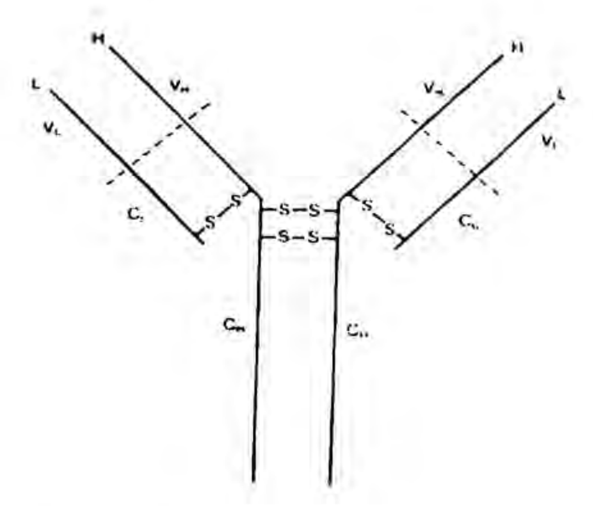
العديد من المستضدات نتيجة لذلك على نشوء عدد كبير جـدا مـن المنـاطق المتغيرة.

ومنذ السنوات التى بدأ فيها كوهلر وملشتين تجاربهما عن دور الطفرات فى نشوء تنوع الجسم المضاد،فقد أظهرت دلائل كبيرة على أن مناطق معينة مـن التسلسلات الجينية المشفرة عن المناطق المتغيرة للجسم المضـاد،كانت تميـل للتطفر،وأن هذه الطفرات هى السبب فى جزء من تنوع الجسم المضاد. وكمـا يحدث،فقد كانت الأجسام المضادة أحادية الاستنسـاخ التـى اسـتخدمها ليفـى وزملاؤه موجهة بشكل محدد إلى المناطق الميالة للتطفر من الأجسام المضـادة المستهدفة على خلايا الورم اللمفى. ولما كانت الطفرات تغير من شكل الأجسام المضادة المستهدفة،فلم تعد تستطيع التعرف علـى الجسـم المضـاد الأحـادى الاستنساخ العلاجى. ونتيجة لذلك،لم تقتل كل الخلايا الورمية،وتوقف تقدم الشفاء من المرض بشكل مؤقت،إن لم يكن توقفا دائما. ومن الواضـح أن المـريض الأول الذى عالجه ليفى كان من المرضى المحظوظين .

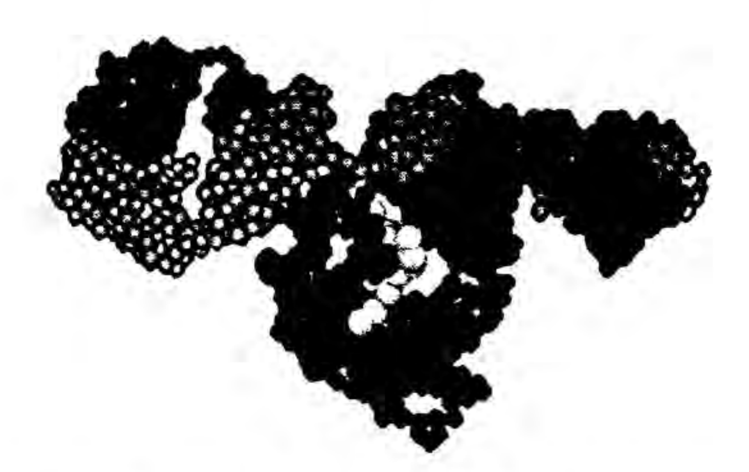
والأشخاص المصابون بأورام لمفية أو بسرطان دم ،والذين لـم يسـتجيبوا للعلاج الكيماوى أو الإشعاع،فقد تجرى لهم عمليـات زرع نخـاع العظم،فـى محاولة أخيرة لإنقاذ حياتهم. وقبل أن يجرى هذا العلاج،يجب تـدمير النخـاع العظمى للمرضى بواسطة العقاقير أو الإشعاع للتخلص مـن مصـدر الـورم الخبيث. ويؤدى هذا العلاج أيضا إلـى عجـز المـريض عـن تكـوين الـدم الطبيعى،ذلك التأثير الذى يصبح قاتلا،أن لم يكن النخاع العظمى المنزرع نشطا.

ويمكن أن تكون عمليات زرع النخـــاع العظمـــيbone marrow transplants شديدة الخطورة . ويكمن مصدر الخطر الرئيسى فى مرض "رفــض العضـــو المنزرع "graft-versus-host،والذى تقوم فيه الخلايا المناعية الناتجة مـــن زرع النخاع بمهاجمة خلايا المريض. وقد تكـــون النتيجـــة إتلافـــا كبيـــرا لنســـيج الخلايا،وربما تؤدى الحالة إلى الوفاة . ولتقليل خطورة هذا المرض،يجـــب أن يتوافق تكوين مستضد خلايا الواهب توافقا شديدا مع خلايـــا تكـــوين مستضـــد المريض. والطريقة الأخرى لمحاولة منع مرض رفض العضو المنزرع -graft versus-host،هى معالجة نخاع العظام قبل زرعه بواسطة جسما مضادا أحادى الاستنساخ،يتعامل مع الخلايا المسببة للهجوم المناعى فى نسيج جسم المريض.

إلا أنه لا يوجد دائما الأشخاص المناسبين الواهبين لنخاع العظام لكل مريض يستفيد من زرع النخاع. وربما تساعد الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فـــى هذا المضمار أيضا. والفكرة هنا،هى إزالة بعض من نخاع عظم المريض،قبـــل أن يتعرض للجرعة المدمرة المبيدة لنخاع العظم،سواء بالكيماويات أو بالإشعاع. بعد ذلك ينظف نخاع العظم من خلايا سرطان الدم بالعلاج بمستحضر مناســـب من جسم مضاد أحادى الاستنساخ،ويعاد إدخاله إلى المـــريض. وفـــى إحـــدى المحاولات المبكرة بهذا العلاج،استطاع لى نادلرLee Nadler الذى يعمـــل فـــى معهد سرطان دانا–فاربر،أن يخمد الورم فى كل الأربعين مريضا بالورم اللمفى الذين عالجهم حتى الآن. وظل منهم حوالى ٦٠% معافون تماما من المـــرض لمدد تصل إلى أربعة سنوات.



شكل ١٢-٥ رسم يوضح جزيء جسم مضاد. تتكون جزيئات الجسم المضاد من أربعة سلاسل بروتينية :سلسلتان ثقيلتان متماثلتان(H) وسلسلتان خفيفتان متماثلتان(L).وترتبط السلاسل ببعضها كما هو مبين بروابط الديسلفايد بين بقايا الحمض الأميني سيستين. وتحتوى كل سلسلة خفيفة وسلسلة ثقيلة على منطقة متغيرة(VLوVH) ومنطقة ثابتة(CLوCH). ويحتوى جزيء الجسم المضاد على موقعين ربط بالمستضد ، واللذان يتكونان من مناطق متغيرة من السلاسل الثقيلة والخفيفة.



شكل ١٢-٦ نموذج لجزيء جسم مضاد. تظهر فى هذا الشكل السلاسل الثقيلة باللون الأزرق والبرتقالى والسلاسل الخفيفة باللون الأخضر. ويحتوى ذراعى الجزيء اللذان يتخذان شكل حرف Y،على مواقع ربط بالمستضد . ويدل اللون الأصفر على بقايا الكربوهيدرات التى تتصل ببروتين الجسم المضاد.

مواطن ضعف محتملة فى العلاج بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

Potential limitations on therapy with monoclonal antibodies

على الرغم من أن الدراسات الإكلينيكيـــة قـــد قـــدمت بعـــض الاكتشـــافات المشجعة،إلا أنها قد أشارت أيضا إلى بعض المشاكل التى تحتاج سوف تحتـــاج إلى حل قبل أن يمكن اعتبار العلاج باستخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ كل شيء إلا أن يكون علاجا تجريبيا إلى حد بعيد . وعلى سبيل المثال،فهنـــاك خمسة أنواع رئيسية من الأجسام المضادة،ولا يزال يحتاج الباحثون إلى تحديـــد ما إذا كانت بعض هذه الأنواع أكثر ملاءمة لتطبيق معين عـــن بقيـــة الأنـــواع الأخرى. وتتعلق الأسئلة الأساسية الأخرى التى تتطلب الإجابة عنهـــا بحجـــم الجرعات التى يجب إعطائها حتى تكون جرعات فعالة،والطريقـــة الأفضـــل لإعطاء الأجسام المضادة(كدواء) لضمان وصولها بصورة فعالة إلـــى مواقـــع الورم.

ويشكل اختلاف أجناسheterogeneity الخلايا الورمية،ما قد يكـــون العقبـــة الكبرى فى استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنســـاخ لعـــلاج الســـرطان. وأظهرت مجموعة دلائل قوية على أن(خلايا الأورام الفردية تختلف فيما يتعلق بسلسلة كبيرة من الخصائص. فقد تتنوع قدرتها على الانبثـــاث، أو الإفـــراز أو الاستجابة للهرمونات ،وفى مدى تأثرها بالعقاقير العلاجية الكيميائية والإشعاع- وفى تركيب المستضدات على سطوحها (شكل ١٢-٧). فقد تحمل بعض الخلايا مستضد يتعرف عليه جسم مضاد،فى حين قد لا تحمل الخلايا الأخرى مستضد .

وعلاوة على ذلك،فقد يسبب ارتباط جسم مضاد أن يختفى مستضد من علـــى سطح الخلية. وفى تلك الحالة،لن تتأثر الخلايا الباقية بعلاجات الجسم المضـــاد الأخرى. ويتطلب العلاج الفعال للسرطان أن تقتل جميع الخلايا ولا يتبقى منها شيء لينشأ منه أورام جديدة. فى حين أن الخلايا التى تنقصها مستضد مستهدف لأى سبب من الأسباب سوف تنجو من تأثيرات الجسم المضاد عليهـــا. ويأمـــل الباحثون فى أنه يتمكنوا من التغلب على مشكلة اختلاف الأجناس،وربما يكـــون ذلك باستخدام مزيج من الأجسام المضـــادة أحاديـــة الاستنســـاخ تتفاعـــل مـــع مستضدات عديدة مصاحبة للأورام. وقد يفيد أيضا إقران الأجسام المضادة مـــع النظائر المشعة،حيث تمتد تأثيرات النظير المشع القاتلة تمتد إلى ما بعد الخليـــة التى ترتبط بالجسم المضاد.

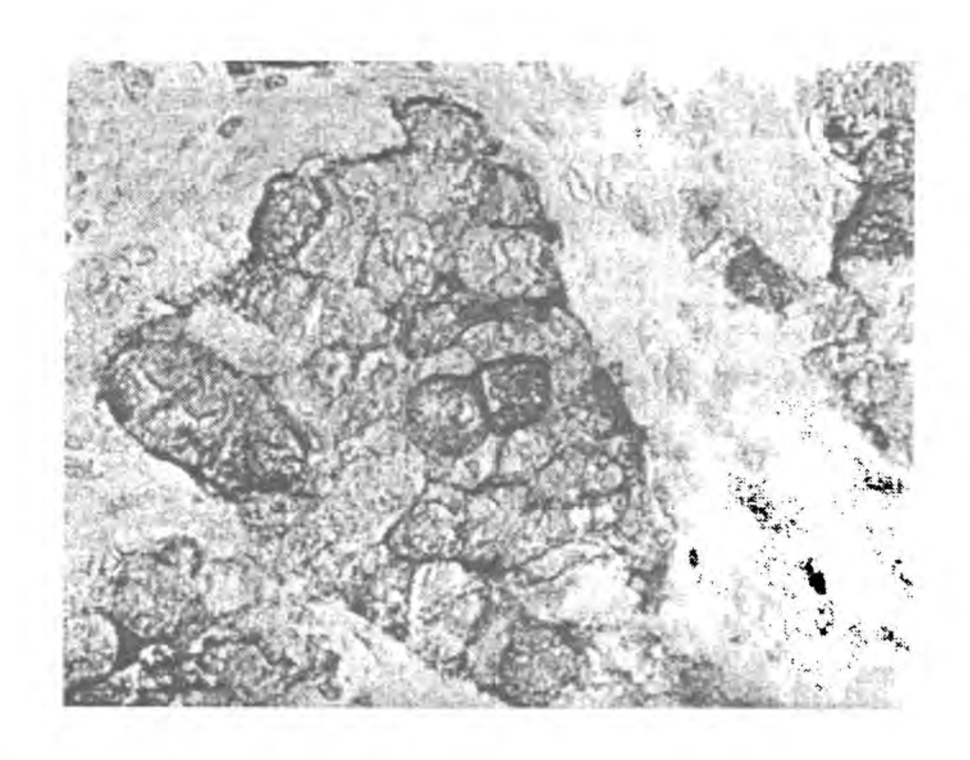
وكما ذكرنا من قبل،فقد استخدمت الأجســـام المضـــادة أحاديـــة الاستنســـاخ المأخوذة من الفأر فى جميع فى التجـــارب الإكلينيكيـــة. فإعطـــاء المرضـــى البروتينات الغريبة كدواء،وخصوصا عندما تعطى بشكل متكرر، من شـــأنها أن تحدث حساسية شديدة وربما قاتلة، تسمى بـــــفرط الحساسيةanaphylaxis. وقد ثبت أن هذا الخطر المحتمل أقل خطورة مما كان يتوقع فى محاولات(تجـــارب) الجسم المضاد أحادى الاستنساخ. وعلى الرغم من أن بعض المرضى قد عانوا من تأثيرات الحساسية بسبب تعاطيهم الأجسام المضـــادة أحاديـــة الاستنســـاخ المأخوذة من الفأر،إلا أن هذه التأثيرات أمكن علاجها ولم يثبت أن أى منها أنه قاتل.

وحتى لو كانت تفاعلات الحساسية الشديدة تسبب مشكلة للعـــلاج بالأجســـام المضادة أحادية الاستنساخ المأخوذة من الفأر،فقد تؤدى التفاعلات المناعية ضد

البروتينات الغريبة رغما عن ذلك إلى تقليل كفاءتها العلاجية. وكان الباحثون يحاولون طيلة سنوات عديدة إنتاج أورام هجين تنتج أجساما مضادة بشرية أحادية الاستنساخ،لكن جهودهم لم تكلل حتى الآن بالنجاح.

وتصنع أورام الهجينHybridomas فى الوقت الحالى بالقدر الذى كانت تصنع به أيام كوهلر وميلشتين. وتحصن الفئران بالمستضد المرغوب،وبعد ذلك تعزل الخلايا المنتجة للجسم المضاد من طحال الحيوانات لإدماجها مع خلايا الورم النخاعيmyeloma cells. ومن الواضح أنه لا يمكن الحصول على الخلايا المنتجة للجسم المضاد من البشر بهذه الطريقة.

وقد يكون هناك سبيلا لحل هذه المشكلة،لأن العديد من الأورام تصب المستضدات فى الدورة الدموية،والتى تؤدى قد تؤدى إلى إحداث استجابة جسما مضادا. وإدماج خلايا الورم النخاعى مع الخلايا B المنتجة للجسم المضاد من دم مرضى السرطان،يمكن فى هذه الحالة أن تأتى بأورام الهجين التى تنتج أجسام مضادة أحادية الاستنساخ بشرية تتعامل مع الخلايا الورمية، ولهذا رأت مجموعة سكلوم أن هذا الأسلوب سينجح. ومع ذلك،فقد كانت التى صنعت من دمج الخلاياB من مرضى سرطان الثدى مع خلايا الورم النخاعى للفأر غير مستقرة،كما هى الحالة دائما بين الهجن مختلفة الأنواع. ولم تطور بعد خلايا الورم النخاعى البشرى التى تعتبر مناسبة لإنتاج الورم الهجين.



شكل ١٢-٧ اختلاف أجناس الخلية الورمية. يمكن أن تختلف خلايا الأورام البشرية عن بعضها البعض من عدة نواح بما فيها أنواع المستضدات التى تحملها. وعندما صبغ هذا الورم السرطانى فى الصدر مع جسم مضاد أحادى الاستنساخ،أصبحت بعض الخلايا شديدة الصبغية (البنى الغامق)، وأصبحت الأخرى خفيفة الصبغية ، ولم يرتبط البعض بالجسم المضاد على الإطلاق. ويمكن أن يمثل هذا الاختلاف فى الجنس مشكلة فى تجارب علاج السرطان بالأجسام المضادة أحادية الاستنساخ. فالخلايا التى لا ترتبط بالجسم المضاد قد تنجو من تأثيراته القاتلة،وتظل باقية وتسبب الورم الخبيث.

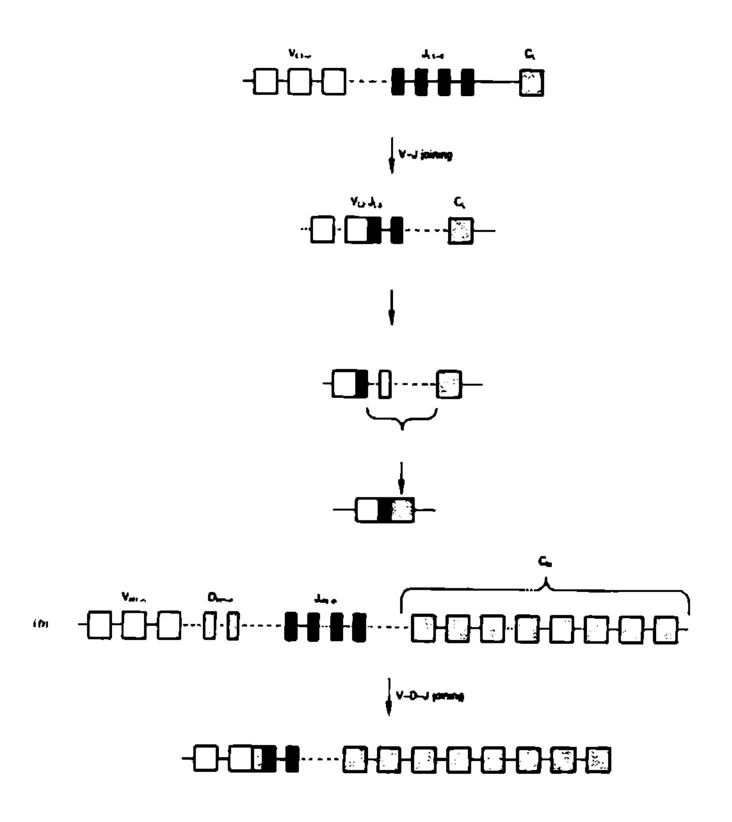
الأجسام المضادة الكميرية

Chimaeric antibodies

قد يقدم البحث الحديث الذى يقرن ما بين الجسم المضاد أحادى الاستنساخ وتكنولوجيات الـــ د.ن.أ المطعم وسيلة لصنع أجساما مضادة ستكون أقل احتمالا لأن تحرض على إبطال الاستجابة المناعية للأجسام المضادة المستخرجة من الفئران فى البشر . وفى الطبيعة، تتجمع مجموعة جينية كاملة لسلسلة خفيفة من جسم مضاد عن طريق ضم ثلاث قطع مختلفة من د.ن.أ (شكل ١٢-

٨). وتكون اثنتان من هذه القطع التسلسل المشفر عن المنطقة المتغيرة،وتشفر القطعة الثالثة عن المنطقة الثابتة من سلسلة البروتين. ويعد تجميع السلاسل الثقيلة متشابها فيما عدا أن ثلاثة تسلسلات الـ د.ن.أ يجب أن تتحد لتكون القطعة الجينية المشفرة عن المنطقة المتغيرة. وهذا التجمع من قطع الـ د.ن.أ الثلاث،هو آلية أخرى من الآليات التى تسمح لجهاز المناعة بتوليد هذا التنوع الهائل من جزيئات الجسم المضاد.

وبمساعدة تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم استطاع الباحثون أن يستفيدوا من خطة الطبيعة فى تخليق الجسم المضاد فى إنشاء أجساما مضادة بمواصفاتها الخاصة. ومن بين "الأجسام المضادة المّصممِة" التى يجرى صنعها الأجسام المضادة المختلطة ،التى تكون فيها المناطق الثابتة من أصل بشرى والمناطق المتغيرة من أصل فأر. والاعتبار العام،هو أن الاستجابات المناعية للأجسام المضادة توجه أساسا نحو المناطق الثابتة من الجزيء. ويتعرض الجهاز المناعى لأى فرد فعلا لعدد ضخم من المناطق المتغيرة،والتى من المحتمل ألا تكون معروفة بسهولة مثل المناطق الثابتة.



شكل ١٢-٨ مجموعة كاملة من جينات الجسم المضاد. (a) تتجمع جينات السلسلة الخفيفة من ثلاث قطع مشفرة منفصلة، وتعطى(V) منطقة متغيرة،و(J) منطقة اتحاد و(C) منطقة ثابتة. وتشفر المنطقة المتغيرة الكاملة لسلسلة البروتين الخفيفة فى القطعV وJ،واللتان تتحدان ببعضهما أثناء نضج الخلايا المنتجة للجسم المضاد. وخلال هذا الاتحاد يمكن أن توصل أى من قطعV العديدة بأى من قطع J، وتساهم بالتالى فى تنوع جزيئات الجسم المضاد. وتظل القطعة المتصلةV-J منفصلة عن قطعة المنطقة الثابتة إلى أن ينسخ نطاق الـــ د.ن.أ كله فى ر.ن.أ الرسول،وفى ذلك الوقت ينفصل ر.ن.أ بين قطعتيV-J وC.(b) تشبه تجميعة السلسلة الكاملة الثقيلة للجينات سلسلة الجينات الخفيفة،فيما عدا قطع الـ د.ن.أ الثلاث-JوVوD(للتنوع)- تكون مطلوبة لتشفر عن المنطقة المتغيرة للسلسلة الثقيلة. بالإضافة إلى ذلك، توجد عدة مناطق ثابتة مختلفة. ويتحدد نوع الجسم المضاد المنتج الأخير،والذى يصبح متصلا بواسطة المناطق الثابتة بالقطعة المكملةV-D-J.

والباحثون الذين شاركوا فى تطوير تكنولوجيا الجسم المضاد الكميرى هـم: شيرى موريسونSherie Morrison من كلية الأطباء والجـراحين فـى جامعـة كولومبيا فى نيويورك سيتى،التى عملت مع فيرنون ويVernon Oi من مركـز بيكتون-ديكسون الأحادى الاستنساخ فى مـونتين فيـو بكاليفورنيـا، ومـارك

شولمانMarc Shulman ونوبوميشى هوزيوميNobumichi Hozumi من جامعة تورنتو بكندا، ومايكل نيوبرجرMichael Neuberger من معملMRC للبيولوجيا الجزيئية فى كمبردج بإنجلترا.

ولكى يتم إنشاء جسما مضادا مختلطا ،فإنه يجرى صنع جينــات السلاســل الخفيفة والثقيلة بصورة مستقلة بواسطة طرق تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعــم. والتسلسلات الجينية المستنسخة متوفرة بالفعل للمناطق الثابتــة لنــوعين مــن السلاسل الخفيفة البشرية ولخمسة أنواع من السلاسل الثقيلة البشرية. وتستنســخ التسلسلات الجينية المشفرة عن المناطق المتغيرة فى الفأر بواسطة سلسلة خلية ورم هجين تصنع جسما مضاد أحادى الاستنساخ ذا تخصص مرغوب، ويتولــد الورم الهجين نفسه بطريقة قياسية.

وتتحد بعد ذلك التسلسلات المستنسخة لمنــاطق السلســلة الخفيفــة الثابتــة والمتغيرة مثل السلاسل الثقيلة لتكوين الجينات الكاملــة. وبمجــرد أن تتــوفر الجينات للسلاسل الخفيفة والثقيلة المختلطة فيتم إدخالها سويا فى خلايا النخــاع الورمى للفأر،حيث تصنع البروتينات وتتجمع جزيئات الجسم المضاد الكاملــة. وعلى الرغم من أن نظام صنع الأجســام المضــادة المختلطــة يبــدو نظامــا مرهقا،فإن الخطوات الفردية تعتبر روتينية حاليا .

وتبعا لموريسون، فإن أنواع الأجسام المضادة التى يمكن صنعها محدودة فى المقام الأول من وجهة الباحث التخيلية. وبالإضافة إلى إنتاج الأجسام المضــادة الكميرية البشرية-الفأرية،يستطيع الباحثون،على ســبيل المثــال، أن يصــنعوا أجساما مضادا ذات تخصص ونوعية مرغوبة، تتحدد من تركيب منطقة الثابتة للسلسلة الثقيلة. وبالنسبة لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ،فلا يستطيع

الباحثون التحكم فى نوع الجسم المضاد الذى سينتجه ورم هجين،ويعتبر هذا مهما،لأن الأنواع المختلفة لها وظائف مختلفة.

الأجسام المضادة لمضاد مثال التوالد

Anti-idiotype antibodies

قد لا تكون المناطق الجسم المضاد المتغيرة بنفس الفاعلية كالمناطق الثابتة فى استخراج الاستجابات المناعية،فى حين لا تخلو المناطق المتغيرة تماما من هذه المقدرة،فجزيئات الجسم المضاد تحمل مناطق داخل أو بالقرب من مواقع التعرف على المستضدات التى يمكن أن تعمل على استجلاب إنتاج الجسم المضاد. وهذه المناطق-التى تسمى بمثاليات التولد بلغة علم المناعة- تعتبر صفة مميزة لكل جسم مضاد. والأجسام المضادة التى استخدمتها مجموعة ليفى لعلاج الورم اللمفى للخليةB،كانت فى الواقع موجهة ضد مثاليات مولد الأجسام المضادة على خلايا السرطان.

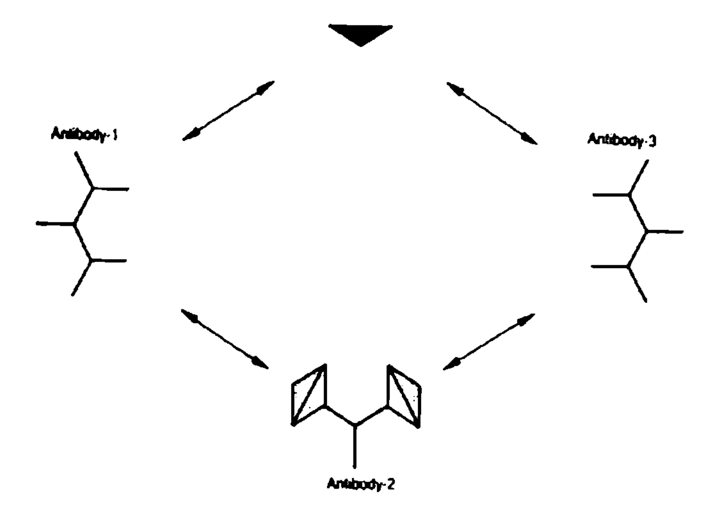
وإحدى الإسهامات التى نال عنها جيرنJerne جائزة نوبل،نظريته "الشبكية" لتنظيم الجسم المضاد. فقد اقترح أن الجهاز المناعى يحتوى على شبكة متداخلة من الأجسام المضادة التى تكون موجهة نحو مثاليات المولد بعضها البعض. وفى ظل الظروف العادية،فإن تركيز كل جسم مضاد يرتدع بالأجسام المضادة لمثال تولده،أى بالأجسام المضادة لمضاد مثال التولد. ودخول مستضد يقلب هذا النظام رأسا على عقب،ويؤدى إلى إنتاج متزايد من الأجسام المضادة التى تتعرف على المستضد . ويؤدى هذا بالتالى إلى إنتاج متزايد من الأجسام المضادة لمضاد مثال التولد المناظر، وفى النهاية إلى نقصان إنتاج الأجسام

لمضادة الأولى. وعلاوة على ذلك، فإن الأجسـام المضـادة لمضـادة لمثـال التولد،تحدث إنتاجا آخر من الأجسام المضادة التـى تتعـرف علـى مثاليـات تولدها(مثاليات التولد المضادة للمضادة)وهلم جرا. وهكذا ينتشـر الاضـطراب خلال الشبكة بصورة تشبه انتشار الفقاقيع فوق سطح بركة. ولا ندرى إن كانت ستعمل شبكة جيرن كما اقترح فى تنظيم إنتاج الجسم المضاد، فلا تزال مسـألة خلافية ، لكنه ليس هناك شك فى وجود الأجسام المضادة لمضاد مثال التولـد . وفى الآونة الأخيرة، تحول الباحثون إلى الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد كنوع جديد محتمل من اللقاح. ويقدم هذا المدخل وسيلة للتحصين ضـد الكـائن العضوى المسبب لمرض ما دون استخدام الكائن العضوى نفسـه. ويمكـن أن تكون هذه ميزة،إذا كان من الصعب زراعة الكائن الممرض أو يصعب التعامل معه،أو إذا كان حقن المادة الممرضة تسبب تأثيرات جانبية ضارة.

وللمستضد وجسمه المضاد شكلان متكاملان،فهما يتوافقان مع بعضهما مثـل توافق المفتاح مع قفله، على الرغم من أنه ليست لجزيئات المستضـد والجسـم المضاد صلابة القفل والمفتاح. ويرتبط جسم مضاد مضاد لمثال التولـد بـنفس منطقة الجسم المضاد التى يرتبط بها المستضد المناظر . ويعنى هذا ضمنيا أن للمستضد والجسم المضاد المضاد لمثال التولد أشكالا فراغية متماثلة. فإذا كانت الحالة كذلك،فيجب أن يؤدى حينئذ التحصين بالجسم المضاد المضاد لمثال التولد إلى إنتاج الأجسام المضادة التى يمكنها التعرف على كلا من الجسـم المضـاد المضاد لمثال التولد والمستضد (شكل ١٢-٩) وإن هذا قد يضفى مناعة وقائيـة ضد المستضد .

ولا تزال محاولات تطوير أجسام مضادة مضادة لمثال التولد كهذه فى بداية مراحلها، فى حين تشير بعض الدراسات إلى أن هذا المسار سينجح. وعلى سبيل المثال،قام رونالد كنيديRonald Kennedy وجوردون دريسمان Gordon Dreesman من المؤسسة الجنوبية الغربية للأبحاث الطبية الحيوية فى سان أنطونيو بولاية تكساس،بحقن الأرانب بالأجسام المضادة البشرية على سطح مستضد فيروس التهاب الكبد الوبائيB. وحفزت الأجسام المضادة البشرية على إنتاج الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد فى الأرانب،والتى تم تنقيتها بعد ذلك واستخدمت فى تحصين الشمبانزى،وهو الحيوان غير البشرى الوحيد الذى يصاب بالتهاب الكبد الوبائيB. وبالتالى فقد صنعت الحيوانات التى تحصنت أجساما مضادة لسطح مستضد الالتهاب الكبدى الوبائيB،وكانت محمية ضد المرض عندما هاجمها الفيروس. بالإضافة إلى ذلك،تقوم مجموعة كوبرويسكى بتطوير لقاح مضاد لمثال التولد للوقاية من فيروس داء الكلب rabies virus،ويجرى اختبار هذه الطريقة كوسيلة ممكنة لصنع لقاح ضد فيروس الأيدز الخطير.

وقد توفر الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد أيضا الحماية ضد السرطان. واكتشف انجيجرد هيلستروم‌Ingegerd Hellstrom وكارل ايرك هيلستروم Karl Erik Hellstrom وزملاؤهما فى مدرسة الطب بجامعة واشنطن فى سيتل،أنهم يستطيعون استجلاب المناعة الموجودة فى الفئران لمستضد سرطان بشرى،عن طريق حقن الحيوانات بجسم مضاد مضاد لمثال التولد. واقترح كوبرويسكى أن استجلاب المناعة فى بعض مرضى السرطان الذين عالجتهم مجموعته بالجسم المضاد أحادى الاستنساخ المأخوذ من الفأر ربما يسهم فى انحسار أورامهم.



شكل ١٢- ٩ شبكة مبسطة من مضاد مثال التولد. والجسم المضاد(antibody-١) الذى نتج استجابة لمستضد يمكن أن يستجلب بنفسه إنتاج الأجسام المضادة المضادة لمثال التولد(antibody-٢). ويجب أن يشابه التركيب الفراغى لجزء الجسم المضاد المضاد لمثال التولد الذى يرتبط بالجسم المضاد الأول التركيب الفراغى للمستضد الأصلى. ونتيجة لذلك ، يجب أن يستجلب التحصين بالجسم المضاد المضاد لمثال التولد إنتاج الأجسام المضادة التى تتعرف على كلا من الجسم المضاد المضاد لمثال التولد و المستضد .

مستقبل الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ

The future of monoclonal antibodies

للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ أكثر مما برهنت عليه فاعليتها فى الأبحاث الأساسية،وبدأت تنتقل من المعمل إلى العيادة. وسوف تستمر التطبيقات التشخيصية فى النمو بسرعة، وسوف تتطور من الاختبارات التى كانت تؤدى على الدم والمواد الأخرى التى كانت تسحب من الجسم إلى التصوير المباشر للأورام السرطانية داخل المرضى. وسوف يكون تطور التطبيقات العلاجية أكثر بطئا،فى حين يؤكد الباحثون على أنهم يتعلمون الكثير عن كيفية استخدام

الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى الناحية العلاجية فى كل تجربة من تجاربهم الإكلينيكية .

وتتعلق إحدى طرق علاج السرطان التى لم تلق حتى الآن اهتماما كبيرا بما إذا كان يمكن استخدام الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ فى منع الخلايا السرطانية من تلقى بعض المنبهات البيوكيميائية الأساسية. وعلى سبيل المثال،إذا كان نمو الخلايا يعتمد على وجود عامل نمو أو على المنتج المنشط لمسرطن،فربما يحدث حينئذ أى جسم مضاد أحادى الاستنساخ يوقف نشاط عامل النمو أو المنتج المسرطن انحسارا للورم.

وقد أوضحت مينا وزملاؤها أن هذه الاستراتيجية قد تنجح. وتنتج خلايا SCLC سرطانات الخلية الصغيرة الرئوية بروتين بومبسينbombesin،وهو بروتين يعمل كعامل نمو لهذا النوع من الأورام الخبيثة. وقد ولّدت مجموعة مينا جسما مضاد أحادى الاستنساخ لبروتين البومبسينbombesin وأوضحت أنه يمنع نمو أورامSCLCالتى زراعتها فى الفئران. ويخطط الباحثون لمحاولة أولية لجسما مضادا فى المرضى. وتشكل المتقبلات التى يجب أن ترتبط بها عوامل نمو مثل البومبسين لكى تحدث تأثيراتها،تشكل هدفا ممكنا آخر للعلاج بالجسم المضاد أحادى الاستنساخ.

وقد لوحظ بالفعل التزاوج بين تكنولوجيات الجسم المضاد أحادى الاستنساخ والـ د.ن.أ المطعم التى تمكن الباحثون من صنع الأجسام المضادة المختلطة والأنواع الأخرى من الأجسام المضادة المتغيرة بواسطة الهندسة الوراثية. ولا

العقاقير أو النظائر المشعة بالأجسام المضادة دون تغيير تخصص الأجسام المضادة أو نشاطها. وعندما تتوفر هذه المعلومات،فقد تتيح تكنولوجيا الأجسام المضادة الكميرية مواقع ربط ملاءمة للعوامل العديدة التى ستنشأ داخل جزيئات الأجسام المضادة.

وتندمج تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ مع التكنولوجيا التى تقوم بإنتاج الأجسام المضادة الموجهة الموقع(أنظر الفصل الرابع عشر). وتستجلب ببتيدات قصيرة إنتاج أجساما مضادة تتعرف وترتبط بنفس التسلسل الببتيدى عندما تحمل داخل بروتينات سليمة. وسوف يسمح هذا للباحثين بأن يختاروا مقدما الموقع البروتينى الذى سيتفاعل مع الجسم المضاد،وهى إمكانية مفيدة عندما يكون الهدف هو التدخل فى بعض الوظائف التخصصية لبروتين مثل النشاط الحفزى لإنزيم أو ربط فيروسا بهدفه. وقد كانت الأجسام المضادة الموجهة الموقع تصنع فى الماضى بطرق تقليدية ،غير أن الباحثين بدأوا فى التحول إلى إنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ موجهة الموقع،فى محاولة توضيح أخرى لتعددية استخدام تكنولوجيا الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

الفصل الثالث عشر

الأجســام المضــادة الموجهــة الموقــع فى البيولوجيــا والطــب

Site-directed antibodies in biology and medicine

لا توفر طريقة جديدة وقوية لصنع أجسام مضادة أدوا بحثية مهمة للباحــث فى علم المناعة، والباحث فى علم البيولوجيا الجزيئية، وكيميائى البروتينــات فقط، لكنها تحمل أيضاً آمالاً عريضة لتطبيقات طبية، مثل التشخيص والوقايــة من الأمراض، وتعد الطريقة الجديدة ثمرة ملاحظة دامت بضع سنوات مضــت بأن الأجسام المضادة التى سوف تتفاعل مع أى موقع تقريباً فى البروتين يمكن أن يستثيرها ببتيد قصير مناظر لذلك الموقع ، ومنذ ذلك الحين، فقد نتجت عــن أبحاث الأجسام المضادة رؤية جديدة عن الكيمياء المناعية وتركيب البروتينــات فى محاليلها، بالإضافة إلى ذلك،لا تزال الجهود مستمرة لاستخدام التكنولوجيــا المنتجة للجسم المضاد فى صنع لقاحات آمنة ومحددة كيميائياً، وكواشف جديدة متخصصة لاختبارات التشخيص.

واكتشاف أن الببتيدات [1] عموماً يمكن أن تثير الأجسام المضادة التى تتفاعل مع البروتينات كان له وقع المفاجأة التى أثارت المجتمع المنــاعى فــى أوائــل

[1] ــالببتيد هو مركب يحتوى على حمضين أمنينيين أو أكثر،وتكون فيه مجموعة الكربوكسيل فى أحد الأحمــاض الأمينية مرتبطة بمجموعة الأمينو فى الحمض الآخر. (المترجم)

الثمانينات، فقد أوضح ف.أندرير F.Anderer من معهد ماكس بلانك منذ عشرين سنة،أن ببتيداً قصيراً يماثل الأحماض الأمينية الستة الأولى للغطاء البروتيني لفيروس فسيفساء الطباق،يثير الأجسام المضادة التى ترتبط بالبروتين السليم، وعلى الرغم من ذلك ،فقد كانت وجهة النظر السائدة فى ذلك الوقت، إن ذلك لم يكن ظاهرة واسعة الانتشار ، وأن معظم الببتيدات لن تكون قادرة على إثارة الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين.

وغالباً ما كانت وجهة النظر هذه نتيجة اعتبارين. الاعتبار الأول: إن الأجسام المضادة التى يثيرها بروتين سليم لا تتفاعل إلا مع بضعة مراكز صغيرة على سطح البروتين، وعلى سبيل المثال،فقد ظهر أن أقل من ٢٥% من الأحماض الأمينية لبروتينات الليزوزوم lysozyme والميوجلوبين myoglobin المتميزة تماماً، مرتبطة بشكل مباشر فى تفاعلات مع الأجسام المضادة، وينطوى هذا الاكتشاف على أنه بدون معرفة سابقة بمراكز ارتباط الجسم مضاد لبروتين،فإن الاختيار العشوائى لببتيد يحتوى على مركز كهذا يكون بعيد الاحتمال .

ثانيا: تعتمد قدرة أى جسم مضاد على الارتباط ببروتين بصورة حاسمة على التركيب الثلاثى الأبعاد (الشكل التركيبى) للبروتين، فالأجسام المضادة التى يستثيرها تركيب طبيعى تتفاعل بصورة ضعيفة،إن لم تكن على الإطلاق، مع بروتين تغير شكله بمعالجات مغيرة للطبيعة، وتقترح هذه النتائج أنه للحصول على أجسام مضادة متفاعلة مع البروتين،فإن العامل المُحصن immunizing agent يجب ألا يكون له فقط نفس تسلسل الحمض الأمينى مثل البروتين بل يجب أن يكون له نفس الشكل التركيبى، وتعتبر الببتيدات الموجودة فى محاليلها

أكثر مرونة، ويمكنها أن تتخذ أشكلاً عديدة أكثر من البروتينات، ودلـت هـذه الاعتبارات بشكل قاطع للعديد، على أن استخدام الببتيدات فى إنتـاج الأجسـام المضادة المتفاعلة مع البروتينات،لا يكون مجدياً إلا فى حـالات خاصـة، ولا يمكن أن تشكل الأساس لتكنولوجيا عامة.

ومع ذلك، فقد نشأت الاعتبارات أساساً من دراسة الأجسام المضـادة التـى نتجت استجابة للبروتينات السليمة، فتخصصات الأجسام المضادة التى أثارتهـا الببتيدات،يمكن أن تختلف تماماً عن التخصصات التى صنعت لبروتينات سليمة، وتصنع الأجسام المضادة التى تولدها البروتينات لإحدى صور الجزيئات الأكثر تقيداً فى الشكل ،فى حين تصنع الأجسام المضادة التى يثيرها الببتيد لصورة أقل تقيداً-ويحتمل أن تكون عشوائية-من صور الجزيء، وبمعنى آخر،لا يمكننا أن نستنتج أن الأجسام المضادة التى أثارها ببتيد لا تكون قـادرة علـى الارتبـاط ببروتين سليم،لمجرد أن الأجسام المضادة التى ولـدها البـروتين فشـلت فـى الارتباط بالببتيد، فتولد المناعة Immunogenicity لا تسـاوى التولـد المضـاد antigenicity عندما نأخذ فى الاعتبار نوعى الجزيئات.

يعنى تولد المناعة، قدرة أى مادة على إثارة أجسام مضادة لترتبط بها،بينمـا يعنى التولد المضاد قدرة أى مادة لأن يتعرف عليها ويرتبط بها مستحضر جسم مضاد معين، وغالباً ما ظهر بعض الالتباس حول هذين المصطلحين ،ويحتمـل أن يكون السبب فى ذلك هو أن الأجسام المضادة تتولد بصورة نموذجيـة مـن المادة نفسها التى تتفاعل معها ، وفى هذه الحالة،فإن مركز مولد المناعة يماثـل بصورة مباشرة مركز تولد مضاد .ومع ذلك،فالأجسام المضادة التـى تثيرهـا

إحدى المواد،غالباً مالا ترتبط فقط بهذه المادة ولكنها ترتبط أيضًا بمادة أخرى،على الرغم من أن العكس ليس صحيحاً. فالأجسام المضادة التى تثيرها مادة ثانية ترتبط بها فقط ولا ترتبط بالمادة الأولى، وعلى سبيل المثال، فالأجسام المضادة التى تثيرها بكتيريا المكورة الرئوية pnecumococcal bacteria ، يمكن أن ترتبط بالبكتيريا وبطبقة عديد السكريات المنقى من البكتيريا،فى حين لا تتفاعل الأجسام المضادة التى تولدت من الطبقة المنتقاة مع البكتيريا السليمة، وبالنسبة للأجسام المضادة التى ترتبط بالبكتيريا،تكون بناء على ذلك طبقة عديد السكريات المنقى مستضادة وليست مولدة مناعة.

مناعة البروتينات

Immunology of proteins

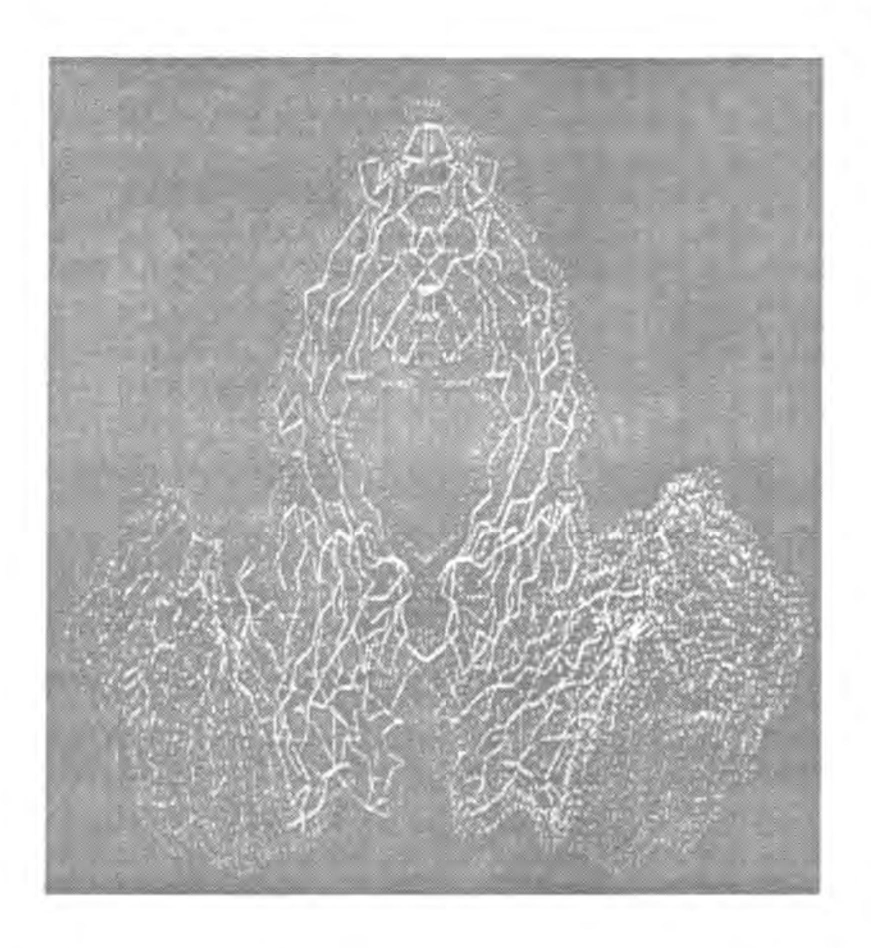
لقد بذل جهد كبير طوال عدة عقود ماضية لتحديد تولد مناعة البروتينات وتولدها المضاد ، وكانت الطريقة النموذجية إثارة الأجسام المضادة بواسطة البروتين الطبيعى وبعد ذلك تقطيع البروتين بواسطة بوسائل كيمائية أو إنزيمية عديدة ،وتحديد أى القطع التى تحتفظ بالقدرة على التفاعل مع الأجسام المضادة، وأبرزت هذه الدراسات صورة محددة المعالم للمواقع المستضدية التى تتعرف عليها الأجسام المضادة التى ولّدتها البروتينات السليمة، وتعتبر هذه المراكز صغيرة- ما بين أربع إلى سبع فضلات أحماض أمينية،تتفاعل بصورة مباشرة مع الجسم المضاد-وقليلة العدد(أشكال ١٣-١و١٣-٢و١٣-٣)، وعلاوة على ذلك، فارتباط الجسم المضاد يعتمد بصورة دقيقة على شكل مستضد البروتين.

ولعبت الدراسات التى أجريت على التركيب المستضدى لإنـــزيم الليـــزوزيم الذى يستمد من بياض بيض الدجاج دوراً تجريبياً رئيساً فـــى تطـــور مفـــاهيم استضاد البروتينات وتولد مناعتها التى سادت فى أواخر الســبعينات ، وكـــان يستخدم الليزوزيم كنموذج للبروتينات الكروية،لأنه مولد مناعة عال وصغير،إذ يحتوى على ١٢٩ فضلة حمض أمينى فقط فى سلسلة عديد الببتيــد الواحــدة، وعلاوة على ذلك،فقد تم تحديد التركيب الثلاثى الأبعاد للبروتين بطرق الكشــف عن البلورات بالأشعة السينية.

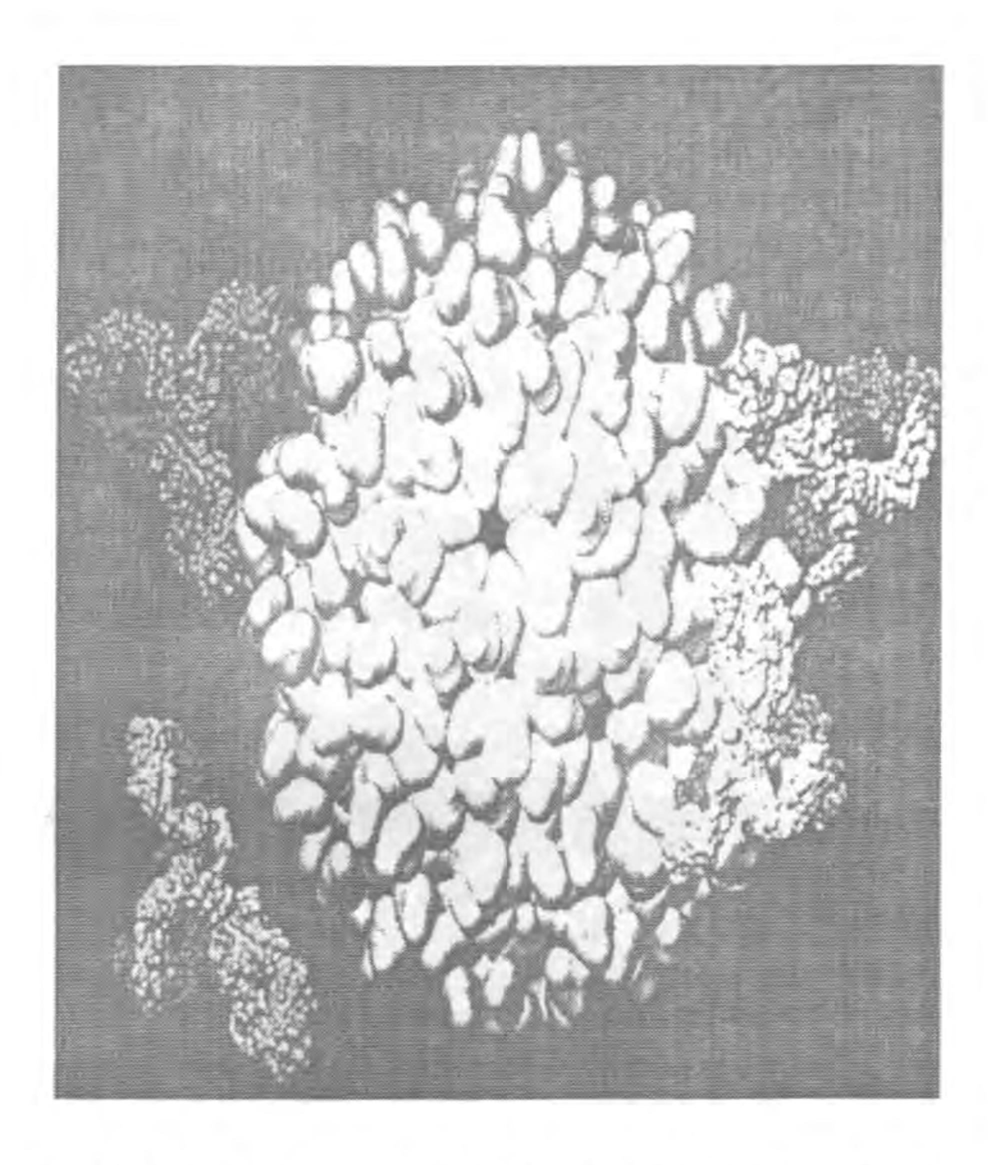
وكان يتم الحصول على الأجسام المضادة فى معظــم دراســـات الليـــزوزيم بتحصين ماعز أو أرنب ببروتين سليم مشكل بصورة نموذجية طبيعية، وبـــذلك كانت الدراسات تحدد المراكز الاستضادية التى تعرفت عليها الأجسام المضـــادة التى أثارها الليزوزيم الطبيعى.

ولعبت أربع روابط ثنائى كبريتيد دوراً مهماً فى كبح الليزوزيم فى تركيبـــه الطبيعى الثلاثى الأبعاد ، وجاءت الدلالة الأولـــى علـــى أن ارتبـــاط الأجســـام المضادة بالمراكز المستضادية المناظرة يعتمد بدرجة كبيـــرة علـــى التركيـــب الشكلى لهذه المواقع من خلال التجارب التى جعل فيها جزيء الليزوزيم ينفـــرد (بعد أن كان مطويا) بمعالجته بعوامل مغيرة لحالته الطبيعية،وبعد ذلك تمزيـــق روابط ثنائى الكبريتيد بعوامل مختزلة، وأبطلت هذه المعالجة بشكل كامل تقريباً قدرة الأجسام المضادة التى تولدت فى الأصل من البـــروتين الطبيعـــى علـــى الارتباط بالجزيء، وبطريقة عكسية،ارتبطت الأجسام المضادة التـــى أثارهـــا البروتين التى تغيرت طبيعته بسهولة بالجزيء الـــذى تغيـــرت طبيعتـــه،ولكن

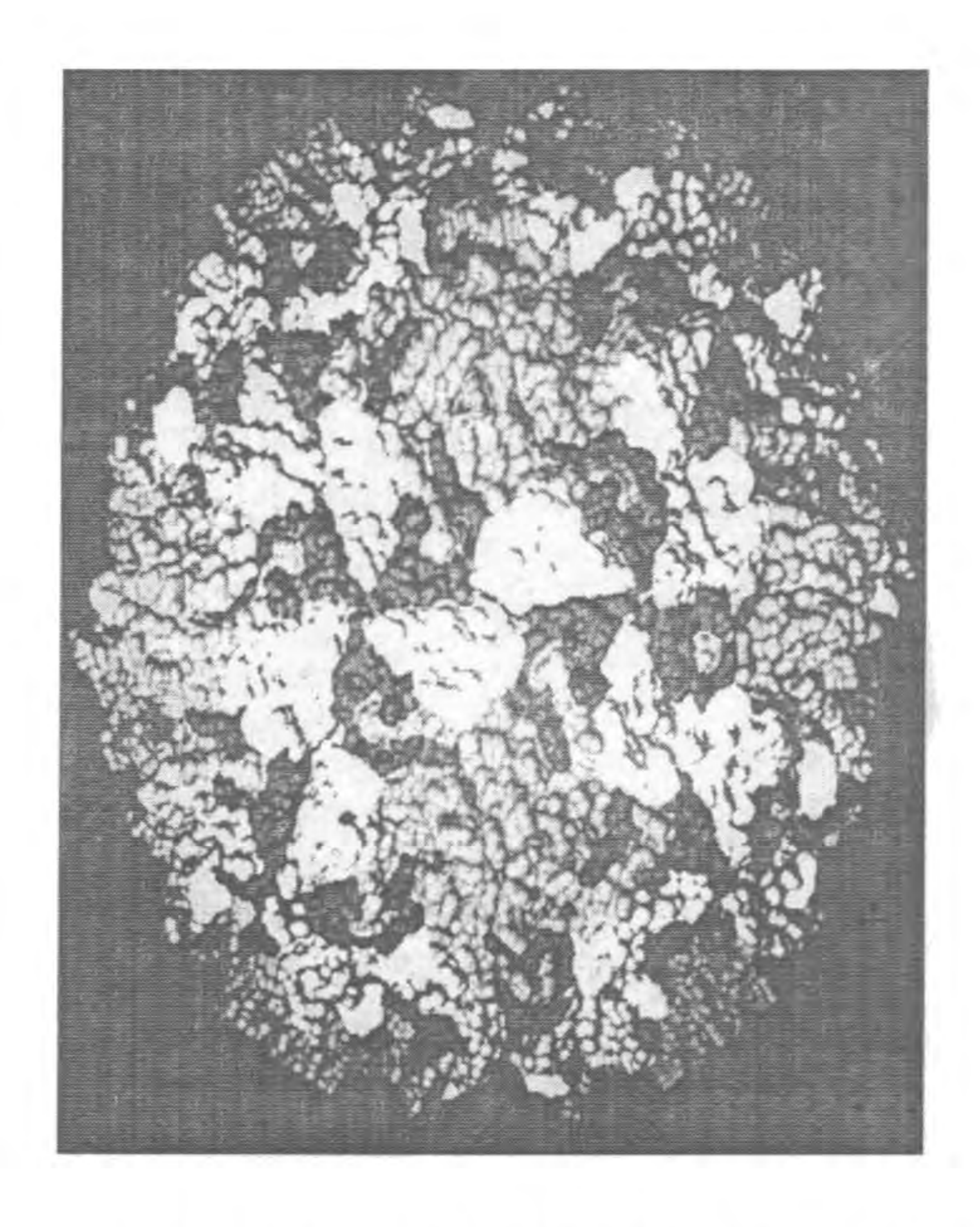
بطريقة ضعيفة أو لم ترتبط على الإطلاق بالليزوزيم المشكل بطريقة طبيعيـــة، وأوضحت هذه النتائج أن الأجسام المضادة،لا تقرأ تسلسلات الأحماض الأمينية بطريقة بسيطة،ولكن يجب أن تتعرف وترتبط بشيء ما خاص بشكل البـــروتين المستهدف.



شكل ١٣ ــ ١ تمثيل تخطيطي بواسطة الكمبيوتر لتركيب جزيء الجسم المضاد، جزيء الجسم المضاد هو بروتين يتخذ شـــكل حـرف y،الذي يتكون من أربع سلاسل بروتينية، وتمتد السلسلتان البروتينتان الثقيلتان(السطوح الزرقاء) من الجذع Y إلى الأذرع. وتنحصر السلسلتان البروتينيتان الخفيفتان(السطوح الخضراء) في الأذرع ، ولكل سلسلة من السلاسل الأربع منطقـة ثابتـة(الهيكـل الصـفراء والبيضاء)ومنطقة متغيرة(الهيكل الأحمر)، وتشكل المناطق المتغيرة المشتركة من السلاسل السلاسل الثقيلة والخفيفـة منـاطق تعـرف مستضد للجسم المضاد.



شكل ١٣ ـ ٢ نموذج تخطيطى بالكمبيوتر لأربع جزيئات من الجسم المضاد تتفاعل مع جزيء فيروسى افتراضى(يظهر باللون الذهبى)، وتظهر السلاسل الثقيلة للجسم المضاد باللون الأزرق والسلاسل الخفيفة باللون الأحمر المزرق، ويبين النموذج الأطوال النسبية للأجسام المضادة وهدفا فيروسيا نموذجيا، ولا يلامس كل جزيء من الجسم المضاد إلا جزء صغيرا من السطح الفيروسى، وتتقيد تفاعلات الأجسام المضادة أيضا بالبروتينات الفيروسية بقطع صغيرة من هذه البروتينات.



شكل ١٣ ــ ٣ نموذج تخطيطى للكمبيوتر لفيروس التهاب سنجابية النخاع polyvirus، وتحدد الألوان الزرقاء والصفراء والبرتقالى،البروتينات المختلفة على السطح الفيروسى، وتدل المناطق البيضاء على قطع ارتباط الجسم المضاد فى البروتينات الفيروسية،والتى لا تشكل مرة أخرى إلا جزء صغيرا من هذه البروتينات.

ولمعرفة المواقع المستضادية لليزوزيم وتحديدها والتي ترتبط بالأجسام المضادة التي أثارها الإنزيم الطبيعي،قام م.أتاسي M.Atassiمن كلية طب بايلور في هيوستون بولاية تكساس وزملاؤه المشاركين بقطع الإنزيم وقاسوا ارتباط الأجسام المضادة بالقطع العديدة، وقد استطاعوا بهذه الطريقة تحديد ثلاثة مراكز مستضادة ارتبطت بأكثر من ٩٠% من الأجسام المضادة، ويشمل المركز الأول فضلات الأحماض الأمينية من٥ إلى ١٤ ومن ١٢٥ إلي١٢٨،والتي تجمعت مع بعضها على سطح الإنزيم بواسطة رابطة ثنائي كبريتيد بين أحماض السستينات ٦ و١٢٧، ويحتوي المركز الثاني على فضلات من ٦٠ إلى ٨٠ ومن٨٧ إلى ٩٠،والتي تلتصق بجوار بعضها بواسطة روابط ثنائي الكبريتيد بين السستينات٦٤ و٨٠ وبين السستينات٧٦ و٩٤، واشتمل المركز الثالث فضلات من ١١٣ إلى ١١٦ و٣٠ إلى ٣٤،والتي ارتبطت ببعضها برابطة ثنائي كبريتيد بين فضلات السستينات٣٠ و١١٥.

ولإيجاد أي فضلات خاصة داخل المراكز الثلاثة تتفاعل بشكل مباشر مع الأجسام المضادة،قام أتاسي وزملاؤه بتخليق ببتيدات قصيرة كيميائياً لكي يستنسخوا الأشكال التركيبية للأحماض الأمينية في هذه المواقع ، وقد افترضوا أن الأجسام المضادة في محاليلها لن تتفاعل إلا مع فضلات الأحماض الأمينية على سطح البروتين المستهدف، وبواسطة التركيب البللوري بأشعة أكس لليزوزيم،استطاع الباحثون تحديد أي فضلات المراكز المستضدية الثلاثة لليزوزيم كانت مكشوفة على السطح،ولذلك كانت تختارها الفضلات، وباستخدام الحمض الأميني جليسين "كمباعد"،قاموا بعد ذلك بتخليق الببتيدات التي كانت تثبت فيها الأحماض الأمينية في المواضع الصحيحة بالنسبة لبعضها البعض.

وبتحليل قدرة سلسلة من هذه الببتيدات"المحفـــزة الســـطح" علـــى الارتبـــاط بالأجسام المضادة الذى أثارها الليزوزيم الطبيعى،ظهر أن الفضلات المطلوبـــة لـــربط الجســـم المضـــاد بـــالمركز ١هـــى: الأحمـــاض الأمينيـــة الأرجينينات٥و١٤و١٢٥وحمض الجلوماتيك٧والليسين١٣؛وكانـــت الفضـــلات المطلوبـــة فـــى المركـــز ٢هـــى: الحمـــض الأمينـــى التربتوفـــان٦٢ والليسين٩٦و٩٧والأسباراجين٩٣والثريونين٨٩ وحمض الأسباراتيك٨٧؛وفـــى المركز الثالث:الليسينات٣٣و١١٦والأسباراجين١١٣والأرجينـــين١١٤والفنيـــل الألانين٣٤، وصمم أتاسى وزملاؤه هذه الأحماض الأمينية الســـتة عشـــر،لأنها تعتبر الفضلات "المهمة " لربط الجسم المضاد، ومع ذلك،فإن الفضـــلات التـــى تأمر بطى جزيء البروتين،على الرغم من أنها لا تتصل اتصالاً مباشراً بجزيء الجسم المضاد المرتبط، فإنها تعتبر أيضاً مهمة ،بمعنى أنها ضرورية من أجـــل الاحتفاظ بشكل البروتين الصحيح.وتشكل كل من المجموعـــات الـــثلاث مـــن الأحماض الأمينية الأساسية جزءا فراغياً مستمراً من البروتين،على الرغم مـــن تباعد الأحماض الأمينية الفردية عن بعضها الـــبعض فـــى التسلســـل الطـــولى لليزوزيم، وعلى فرض أن الفضلات الأساسية تكون فى أوضـــاعها الصـــحيحة بحيث لا تتفاعل بطريقة صحيحة مع الأجسام المضادة إلا فى البروتين المطوى ،فليس من المثير للدهشة أن تغيير الطبيعة يلغى أساساً ارتباط الجســـم المضـــاد بجزيء الليزوزيم.

والتجارب التى أجريت فى أواخر الستينات وأوائل السبعينات فـــى معامـــل ميشيل سيلا ورث أرنون،وكلاهما من معهد وايزمان فـــيRehovot بإســـرائيل وكريستيان أفينسين من المعاهد القومية للصحة فى بتسدا بولاية مريلاند،اقترحت

أيضاً أن محددات المستضدية والمناعية للبروتين هى محددات تعتمد على الشكل التركيبى، وتشكل الفضلات من٦٤ إلي٨٠ لليزوزيم تركيباً حلقياً علــى ســطح البروتين المتماسك بواسطة رابطة ثنائى الكبريتيد بــين السســتينات ٦٤و٨٠، ويمكن الحصول على هذه الحلقة،إما بواسطة الانقسام من البروتين،أو بواســطة التخليق الكيميائى،وقد استخدمها سيلا وأرنون وأنفينسين وزملاؤهم فى اختبار ما إذا كان يؤدى فتح الحلقة إلى تغير مناعيتها واستضاديتها.

وتفاعلت الأجسام المضادة المستثارة لليزوزيم الطبيعى أو للحلقة المغلقة بقوة مع البروتين السليم والحلقة المغلقة،فى حين تفاعلت بصورة ضعيفة أو لم تتفاعل على الإطلاق مع الحلقة المفتوحة، وفى المقابل، لم يمكن للأجسام المضادة التى صنعت للحلقة المفتوحة أن تتفاعل إلا مع حلقة مفتوحة، وأظهرت التجارب مرة أخرى أن الأجسام المضادة تتفاعل مع مستضدات فريدة فى الشكل ، والأكثر من هذا، اقترحت الدراسات،أن من الضرورى إنتــاج تركيبــات معقــدة لإنتــاج مستضدات تخليقية يمكن أن ترتبط مع الأجسام المضادة التى تستثيرها بروتينات سليمة.

مهمة كهذه ستكون صعبة فى أحسن الأحوال،ولا تكون مفيدة إلا عندما يتحدد التركيب الثلاثى الأبعاد الكامل للبروتين، وهنــاك نتيجتــان عامتــان بالنســبة لمحددات المستضدية،ألا وهما أنها قليلة العدد نسبياً وغير متصلة،وتعتمد إلى حد بعيد على الشكل التركيبى ، لم تنتظر طويلا الجهود الموجهــة نحــو تحســين تكنولوجيا عامة لتوليد الأجسام المضادة لأى موقع بروتينى.

على أنه فى الآونة الأخيرة ،انتقدت فكــرة وجــود مراكــز قليلــة تحــدد الاستضادية الكلية لبروتين ما انتقاداً شديداً، فقد أظهرت دراسات الليزوزيمــات

التى تحمل بدائل الحمض الأمينى لمواضع خارج المراكز الاستضادية التى تعرفت عليها مجموعة أتاسى ، على سبيل المثال، أن الليزوزيمات المختلفة يمكن تمييزها بتفاعل جسمها المضاد، وتوضح هذه النتيجة أنه يوجد الكثير من المراكز الاستضادية عما كان يعتقد من قبل، وأنه لا يزال من الممكن بطبيعة الحال أن يتغير مركز من مراكز المحددات الأصلية بتغير حمض أمينى فى موضع آخر.

وقد أعطت الدراسات التى قامت بها سندرا سميث-جيل وزملاؤها فى المعاهد القومية للصحة دعماً إضافياً للاقتراح بأن هناك مراكز مستضادية أخرى على الليزوزيم، وعندما صنع هؤلاء الباحثون جسماً مضاداً أحادى الاستنساخ(انظر الفصل الثانى عشر) لليزوزيم دجاجة،وجدوا أنه يتفاعل بشكل كامل مع ليزوزيمات سبعة أنواع مختلفة من طيور الدجاجيات galliform،وجزئياً مع نوعين آخرين من أنواع galliform، ولم يتفاعل على الإطلاق مع ليزوزيم البط.

وبمقارنة تسلسلات الأحماض الأمينية للبروتينات، حددت مجموعة سميث-جيل أن مركز ربط الجسم المضاد المحتمل،يشتمل الأرجينين ٤٥والأرجينين٦٨ ويمتد إلى الشق بين أرجينين٤٥ وأرجينين١١٤، ويوجد هذا المركز خارج المراكز التى حددتها مجموعة أتاسى.

وقد يكون غير واقعى افتراض أن تولد المناعة وتولد المضاد الكاملة لبروتين ما،يمكن أن تتحدد بواسطة مستحضر واحد من الجسم المضاد، إن ما يعتبر

مستضاداً قد يعتمد كثيراً على نظام تمثيل المستضد والأنواع المحصنة كما يعتمد على تركيب مستضد البروتين.

مولدات المناعة الببتيدية التخليقية

Synthetic peptide immunogens

في عام ١٩٨٠، بدأت تظهر دلائل أخرى تعارض اتجاه التفكير الـذى رأى عدم احتمال أن تثير ببتيدات صغيرة نسبياً أجسام مضادة يمكنها التفاعـل مـع بروتينات سليمة تحتوى على تلك التسلسلات الببتيدية، فعندما أكمـل ريتشـارد ليرنر Richard Lerner وزملاؤه في معهد أبحاث سكبرس كلينيك فـى لا جـولا بكاليفورنيا تحديد التسلسل النكليوتيدى لفيروس مولونى سرطان الـدم الفـأرى Moloney leukaemia ،صادفهم موقع "غامض" كان يقع في نهاية الطرف الأيمن من جينenv الفيروسى،الذى يشفر عن بروتينات الغـلاف الفيروسـى، وكـان للموقع المعنى إمكانية التشفير عن بروتين،فى حين لم يظهر البروتين المتنبأ عنه أنه يماثل أى من البروتينات الفيروسية المعروفة.

ولتحليل هذه القطعة من موقع تشفير env، قام باحثو سكربس بتخليق ببتيـد بطريقة كيميائية يناظر النهاية الكربوكسيلية للبروتين المتنبأ عنه، وقاموا بصنع أجساما مضادة للبتيد واستخدموها في البحث عن البروتينات الفيروسـية التـى تحتوى على التسلسل، وتفاعلت الأجسام المضادة معهـا ورسـبت بـروتينين فيروسيين من الخلايا المصابة، وكان أحدهما البروتين الكبير،الذى يعتبر البشير الذى قطعت منه البروتينات الغلافية. وظهر أن الثانى بروتين صغير يحتوى كلاً

من البروتين الغلافى(المسمى بـــــp١٥E)، والتسلسل الذى شــفر فـــى الموقـــع الغامض لمجموعة العوامل الوراثية الفيروسية.

وكما اتضح، فلم يناظر البروتين الغامض أى مـــن البروتينـــات الفيروســـية المعروفة،لأنه انفصل من البروتينp١٥E عندما بدأ فيروس سرطان الدم يتبرعم من الخلايا، ومع ذلك، فإن البشير الذى يحتوى عليp١٥E والبروتينات الغامضة يمكن أن تكشف عنه الأجسام المضادة، ومن ثم تحل مشكلتين فى نفس الوقـــت: منتج موقع محتمل يشفر عن البروتين فى مجموعة العوامل الوراثية الفيروسية قد يحدد،ويتعقب مصير أثر جزء صغير من البروتين بصورة محددة أثناء نضج الفيروس.وفى نفس الفترة تقريباً،قام باحثون من معمل راسل دوليتـــل Russell Doolittleبجامعة كاليفورنيا فى سان دييجو بصنع أجسام مضادة لتخليق ببتيدات مناظرة لمواقع النهايات الكاربوكسية والأمينية لمستضد ورم كبيـــر لفيـــروس القرادي٤٠، وأوضحوا أن الأجسام المضادة تفاعلت بصورة محددة مع البروتين السليم، وبجمع هاتين الدراستين معاً، استطاعتا أن تحييا إمكانية استخدام مولدات المناعة الببتيدية فى إنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، بيد أنه كانت هناك معضلة فكرية لا تزال فى حاجة للتغلب عليها.

فى كلتا الدراستين اللتين ذكرتا من قبل، صنعت أجساماً مضادة من ببتيـــدات مناظرة لنهايات البروتينات،والتى غالباً ما تختل وربما يكون محاكاتها بالببتيدات القصيرة أكثر سهولة. وإذا عدنا إلى دراسات أندرير فى عام ١٩٦٣،فقد كـــان هناك بعض النجاح فى استخدام نهايات البروتينات كمولدات مناعة ، غير أنه لم تحدث محاولات كبيرة للتقدم أكثر من هذا، ونتيجة لذلك،كان لا يـــزال هنـــاك بعض اليقين فى أن هناك ببتيدات بخلاف قطع النهاية يمكن استخدامها فى إنتاج

أجسام مضادة للبروتينات، وإذا كانت التكنولوجيا قاصرة على استخدام قطع النهاية،فمن المؤكد أن مولدات المناعة الببتيدية لن تكون طريقة عامة للحث على تكون كواشف مستمنعة متخصصة المركز لدراسة البروتينات.

ويتطلب البحث الكامل عما إذا كانت الببتيدات المناظرة لتسلسلات فى البروتينات يمكنها أن تثير بصفة عامة أجسام مضادة تتفاعل مع البروتينات السليمة، بروتين يتفق مع معايير صارمة معينة، فيجب أن يكون تسلسل حمضه الأمينى وتركيبه الثلاثى الأبعاد معروفاً ، ويجب أن تحدد مراكزه المستضادة والمستمنعة على تركيب الجزيء، ويفى بروتينhaemagglutininالهيماجلوتنين لفيروس الإنفلونزا،الذى يقع على سطح الجسيم الفيروسى بكل هذه المعايير.

يحتوى بروتين الهيماجلوتنين على اثنين من عديدات الببتيد المختلفة،اللذين يسميان HA١ وHA٢. وأثناء فترة استجابة مناعية لعدوى طبيعية بفيروس الإنفلونزا أو لهيماجلوتنين منقى، تصنع أجساماً مضادة ترتبط أساساً بأربعة مواقع مستضدية فقط، تبعا لدونالد ويلى وزملاؤه فى جامعة هارفارد،الذين قاموا بعمل خريطة لأماكن المراكز التى كانت جميعها على HA١.واستطاعت نيكولا جرينNicola Green وزملاؤها فى معمل لرنر أن تخلق عشرين ببتيداً مختلفاً، تمثل مجتمعة حوالى ٧٥% من التسلسل الأولى لـHA١، ولم يقم الباحثون بأية محاولة لمحاكاة التركيب الثلاثى الأبعاد الذى أظهرته المواقع المناظرة للبروتين، وعلاوة على ذلك، تماثل الببتيدات الفردية المواقع التى تظهر تركيبات ثانوية متنوعة: حلزونات ألفا alpha-helices وbeta-pleated sheats وحلقيات

loops وأشكال ممتدة، وكانت الببتيدات مرتبطة ببروتينات حاملة وحقنــت فــي الأرانب لإثارة أجسام مضادة.

ومن العشرين ببتيداً،أثار ثمانية عشر منها أجساماً مضادة تفاعلت مع جزيء هيماجلوتنين كامل أو مع فيروس سليم، وكانت النتيجة الرئيسة هى أن الثمانيــة عشر ببتيداً، لم تكن بالضبط من المراكز المستضادية الأربعــة التــى حــددتها مجموعة ويلى،لكنها كانت من أماكن متفرقة من كل تسلسل الحمض الأمينــى HA١. والمطلب الوحيد لكى يولد ببتيد أجساماً مضادة متفاعلة مع البروتين،هو أن الببتيد يجب أن يمثل موقع على سطح البروتين، وتدل نتائج التجربة على أن المعلومات المحمولة داخل ببتيد طولى قصير نسبيا تكفى للحث على تفاعلية ضد جزيء بروتينى أكثر ضخامة ذى تركيب ثلاثى أبعاد معقد، وتقترح أنه يمكــن استخدام مولدات المناعة الببتيدية المخلقة كيميائياً فى توليد أجسام مضادة تتفاعل مع معظم مواقع البروتين.

وتوضح الدراسة أيضا أن تولد المناعة لبروتين سليم هى أقل من مجمـــوع تولد مناعة أجزائه ، وبمعنى آخر، توجد مناطق من بروتين لا تكون مستمنعة عندما تظهر أمام الجهاز المناعى كجزء من البروتين السليم،لكنها تكون مستمنعة عندما تمثل كببتيدات، وأحد التفسيرات المحتملة لهذا الاختلاف،هــو أن مواقــع البروتينات غير المستمنعة ظاهرياً تستطيع استثارة إنتاج الجسم المضاد، غير أن هذه الأجسام المضادة لا يكشف عنها اختبار التحييد،الذى يستخدم عادة لتحديــد المراكز المستضدية، وفى هذه الحالة،سيكون لمجموعة الأجسام المضادة الكليــة

لبروتين مثل هيماجلوتنين الإنفلونزا، نمطاً تفاعلياً أوسع مما يلاحظ فى دراسات التحييد.

ومع ذلك، فربما لا تنطبق هذه الحالة على الهيماجلوتنين،لأن مستحضرات الجسم المضاد الفعالة التى تم تحضيرها من بروتين الهيماجلوتنين السليم أو بواسطة فيروس،لا تتفاعل تبادلياً مع أى من هذه الببتيدات التخليقية، وعلى الأصح، يبدو أن معظم الاستجابة المناعية للهيماجلوتنين الطبيعى موجهة ضد المحددات التى لا تحاكيها الببتيدات القصيرة، ويتوافق هذا الاكتشاف مع مجموعة المعلومات التى توضح أن المحددات المستضدية على البروتينات السليمة تتشكل إلى بعيد فى الطبيعة، وإن مثل هذه المحددات نادراً ما تحاكيها ببتيدات قصيرة

وقد أثار التكرار الشديد الذى تستطيع من خلاله الببتيدات استثارة إنتاج أجسام مضادة تتفاعل مع بروتينات سليمة مطوية سؤالاً عن كيف يمكن لببتيد مضطرب نسبيًا توليد أجسام مضادة تتفاعل مع بروتينيات على درجة كبيرة من الانتظام ، وقدم نمونجين لشرح هذه الفكرة . يثير أولهما مسألة تخمينية ، والفكرة هنا،هى أنه يمكن لببتيد فى محلول أن يتخذ أشكالاً متنوعة، يحاكى البعض منها التركيبات الشكلية الموجودة فى البروتينات الطبيعية، وأن الأجسام المضادة المصنوعة لهذا الجزء الصغير من الأشكال الببتيدية،هى فقط التركيبات الشكلية الوحيدة التى تتفاعل مع البروتين المطوى. حينئذ ، فنجاح التكنولوجيا قد يكون دليلاً على حساسية الاختبارات المناعية التى تستطيع الكشف عن نسبة صغيرة من الأجسام المضادة فى خليط أكثر من مجرد شيء أكثر إثارة للاهتمام أصلاً . ومع ذلك، يمكن أن تتخذ الببتيدات فى محاليلها آلاف أو حتى

مئات الآلاف من التركيبات الشكلية ،وكما يحكم عليها من خلال وسائل مطيافية فلا يوجد تركيب شكلى واحد يفضل عن الأشكال الأخرى، وبالفرض حينئـــذ أن التركيبات الشكلية التى تثير أجساماً مضادة فى حيوان معين تختار عشوائياً ،وأن حيواناً معيناً لا يعبر إلا عن جزء صغير من مخزون الأجسام المضـــادة التـــى يمكنها أن تتفاعل مع مستضد ،فقد يتوقع قدر كبير من التغيـــر فـــى الأجســـام المضادة التى يستثيرها ببتيد من حيوان لحيوان ، غير أن الحالة ليست كـــذلك ، فعندما تحصن حيوانات مختلفة بنفس الببتيد، فإنها تميل لأن تنتج نفس مقـــادير الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين.

ولاختبار النموذج التخمينى بطريقة شكلية، استخدم هنـــرى نيمـــان Henry Nimanمن مجموعة ليرنر Lerner group أجساماً مضادة أحاديـــة الاستنســـاخ، كأسلوب لتقدير التكرار الذى تستجلب من خلاله الببتيدات أجسامًا مضادة تتفاعل مع البروتين الطبيعى، وقد صنع أجساماً مضادة أحادية الاستنساخ لكل ببتيد من الببتيدات الستة من البروتينيات الثلاثة المختلفة، واختبر بعد ذلك قدرة الأجســـام المضادة على الارتباط بالبروتين السليم المناسب، وكان ســـبعة عشـــر جســـمًا مضاداً من الواحد وعشرين جسماً مضاداً، التى أثارها ببتيد واحد من بـــروتين الإنفلونزا الهيماجلوتنين قادرة على التفاعل مع جزيء الهيماجلوتنين السليم،وهو تكرار يزيد ١٠٠٠٠٠مرة على الأقل مما كان يتوقع من النموذج التخمينى، وتـــم الحصول على نتائج مشابهة من خمسة ببتيدات أخرى.

التولد المضاد وحرية تحرك قطع البروتين

Antigenicity and the mobility of protein segments

إذا كان النموذج التخمينى غير صحيح،فقد تتفاعل الأجسام المضـــادة حينئـــذ مع التركيبات الشكلية البروتينية التى تختلف عن البروتينات التـــى شـــوهدت أساساً مجمدة فى التركيب البلورى. وقد يحدث أحد البروتينات تغيرًا شكليًا فـــى موقع صغير لبروتين آخر بالارتباط به وهـــو نـــوع مـــن نمـــوذج التوافـــق المستحث،الذى شوهد من قبل فى التفاعلات بين الإنزيمات وركائزها، وصعوبة هذه الفكرة هى أنها إلى حد ما معممة فى الطبيعة ،فى أن الأجســـام المضـــادة يمكنها أن ترتبط بموقع وتشوهه فقط الذى يمكنها التعرف عليـــه، ويبـــدو مـــن المستبعد أن يمكن للأجسام المضادة أن تتعرف على موقع ذى تركيـــب ثلاثـــى الأبعاد لا يكون إلا بعيد الصلة بشكل الارتباط الصحيح.

والاحتمال الثانى هو أن مركزاً معيناً فى بروتين قد يكون إلى حد مـــا حـــر الحركة ويمكن أن يتخذ بعض الأشكال التركيبية ذات الصلة ، وسوف يحـــدث الارتباط حينئذ عندما يمر المركز بشكل تركيبى يتعرف عليه الجسم المضـــاد، وعلى ذلك يعمل الجسم المضاد مثل بالوعة تجذب البروتين إلى هـــذا الشـــكل، وهذا النموذج فى جوهره يزيد بدرجة كبيرة عدد الأشكال التركيبية التى يساهم فيها الببتيد والبروتين السليم، ويتنبأ بأن للببتيدات التى تثير أجساماً مضادة ذات قدرة على التعرف على بروتينات سليمة تقع فى مناطق لها حرية حركة شكلية كبيرة فى البروتين السليم.

وكاختبار لهذه الأفكار، درس ليرنر وزملاؤه فى سكربس ، جون تينر John Tainer واليزابيث جيتزوفElizabeth Getzoff، استضـــادية قطـــع بروتينيـــة كوظيفة لحرية حركتها الذرية ، وكان بروتين الاختبار الذى اختاروه للتجـــارب هو بروتينmyohaemerythrin،وهو صبغ حامل للأكسجين يوجد فى الحيوانات الدنيا التى تشمل بعض الديدان البحرية، وقد استطاعوا حل التركيـــب الثلاثـــى الأبعاد للـــــ myohaemerythrin بتحليل كاف ليقدم مؤشـــرات دقيقـــة لقـــدرة التحرك الذرية خلال الجزيء، وعلاوة على ذلك، فقد كان البروتين غريباً تماماً على الحيوانات التى اعتادت إنتاج الأجسام المضادة. وعادة لا تصنع الحيوانات أجساماً مضادة لبروتيناتها، وقد تفشل أيضاً فى الاستجابة لإنتاج الجسم المضاد لببتيدات من مصادر أخرى، إذا كان للببتيـــدات تركيبـــات مماثلـــة للتركيبـــات الموجودة فى البروتينات الطبيعية، وقد اختير بروتين myohaemerythrin لتجنب مشكلة عدم الاستجابة كنتيجة لهذه القدرة على الاحتمال.

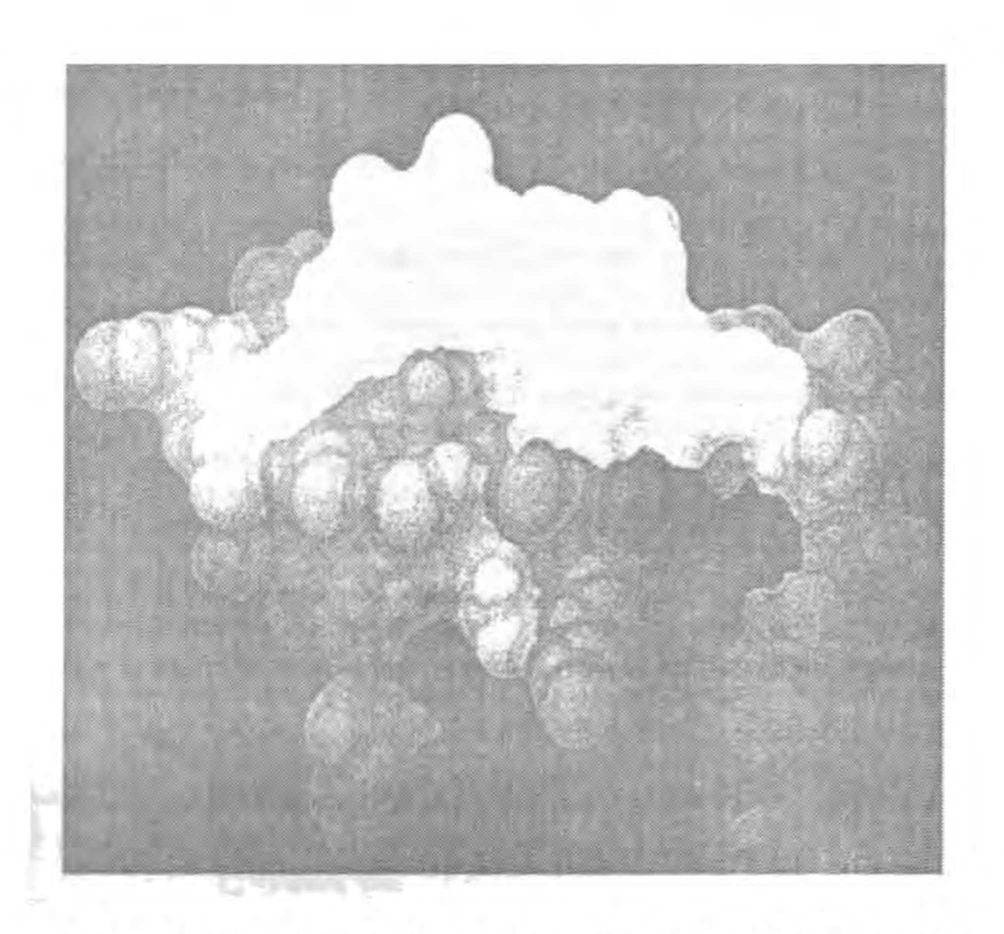
استطاع الباحثون فى سكربس تخليـــق اثنـــى عشـــر ببتيـــداً، تمثـــل قطـــع جزيء myohaemerythrin بدرجات متفاوتة من القابلية للحركة الذرية، وأثـــار أحد عشر ببتيداً من هذه الببتيدات استجابات مناعية قوية، والأجســـام المضـــادة التى نتجت على هذا النحو اختبرت لتفاعلها مع بروتين سليم طبيعى من حيـــث الشكل . وتفاعلت بقوة الأجسام المضادة التى ولدتها ببتيدات مماثلة لمواقع ذات قابلية تحرك ذرى عالية ، بينما لم تبد الأجسام المضادة التى استثارتها ببتيـــدات مماثلة لمواقع ذات قابلية تحرك ذرى منخفضة أدنى تفاعل أو أنها لـــم تتفاعـــل على الإطلاق مع البروتين السليم (شكل ١٣-٤)، وبعد ذلك ولفترة زمنية قليلة ، بدت مواقع البروتين الأكثر قابلية على الحركة إن بإمكانها أن تتخذ أو تســـتحث

على اتخاذ أشكال تركيبية مختلفة عن الأشكال التى شـوهدت فـى التركيبـات البلورية المستقرة ، وقد يفسر هذا السلوك قدرة الببتيدات المضطربة نسبياً على إثارة أجسام مضادة متفاعلة مع البروتين مرات عديدة.احتفظ بـروتين الـــــ myohaemerythrin بشكله الطبيعى أثناء اختبارات التفاعل مع الأجسام المضادة، حيث لم تتغير سلسلة خصائصه المميزة المرئية التى تعتبر حساسة جداً للتغيرات فى التركيب الثلاثى الأبعاد للبروتين، ونتيجة لذلك، يمكـن لمولـدات المناعـة الببتيدية إثارة أجسام مضادة تتفاعل مع البروتينات الطبيعية، و غالباً ما يمكـن لمولدات المناعة هذه نفسها أن تولد أيضا أجساماً مضادة تتفاعل بشكل كامل أو جزئى مع البروتينات التى تغيرت طبيعتها ، وقد يكون لخلـيط مـن الأجسـام المضادة التى تستطيع أن تتفاعل مع كل من البروتينات الأصلية والبروتينـات التى تغيرت طبيعتها منفعة فى المعمل أكبر من مستحضر جسم مضاد تقليـدى الذى لا يمكنه أن يتفاعل بشكل نموذجى إلا مع مستضد له نفس حالة التشـكل مثل مولد المناعة الأصلى.

وقد وجدت علاقة الارتباط بين التولد المضاد والقابلية علـى الحركـة فـى **بروتينيات** أخرى غير بروتينmyohaemerythrin، وعلـى سـبيل المثال،فقـد توصل آرون كلج Aaron Klugمن معمل MRC للبيولوجيا الجزيئية فى كمبردج بانجلترا وM.H.V. Van Regenmortel من معهدCNRS للبيولوجيـا الجزيئيـة والخلايا فى ستراسبورج بفرنسا وزملاؤهم إلى نتيجة مشـابهة فيمـا يتعلـق بالبروتين الغطائى لفيروس فسيفساء الطباق، بالإضافة إلى ذلك، فقـد أوجـدت مجموعة كلج-فان رجنومتريل ومجموعة ليرنـر علاقـة ارتبـاط لليـزوزيم

والميوجلوبين، وأوجدت مجموعـــة ليرنــر علاقـــة ارتبـــاط للهيموجلـــوبين، واللجهيموجلوبين، والسيتكرومc ، والريبونكليز والأنسولين.

وقد كشفت دراسات حديثة أيضاً عن الببتيـــدات أن المراكـــز المســـتمنعة لبروتين قد تكون بالفعل كثيرة جداً ، ولا تقع تماماً على سطح الجزيء، وعلـــى سبيل المثال، فقد حددت مجموعـــة ليرنــر المراكـــز المســـتمنعة لـــبروتين الـــmyohaemerythrin باستخدام ببتيدات طولية قصيرة، وقامت بتحصين سبعة أرانب بالبروتين السليم ،واختبرت بعد ذلك المصل المضاد للتفاعل مع ما يزيـــد على ٢٥٠٠ ببتيداً، اشتملت كل القطع الست المتبقية المحتملة لبروتين الـــــــ myohaemerythrinويتغير تولد المناعة لبروتين تغيراً كبيراً من موقع لآخر ،كما تتغير أيضاً أنماط استجابات الجسم المضاد فى الأرانب السبعة بدرجة كبيرة من حيوان لآخر، وعلى الإجمال، فقد مالت المراكز الأكثر استمناعاً لأن تتواجد فى مناطق ذات قابلية تحرك ذرى عالية ،وكثافة تعبئة منخفضة، وشـــكل محـــدب وقدرة الكتروستاتيكية كبيرة ، ومع ذلك، فقد أنتجت الاستجابات المجتمعة مـــن سبعة أرانب أجساماً مضادة تتفاعل مع مجموعة ببتيدات تحتوى كل فضـــلات الحمض الأمينى الـــ ١١٣ لتسلسل الـــــmyohaemerythrin، وهذا يعنى أنه فى ظل بعض الظروف تظهر كل فضلة من البروتين فـــى موقـــع مســـتمنع مـــن الجزيء، ومرة أخرى تقترح النتائج أن البروتينـــات فـــى محاليلهـــا ليســـت بالتركيبات الساكنة المشاهدة من خلال التصوير بأشـــعة أكس،لكنهـــا جزيئـــات ديناميكية.



شكل ١٣ ـ٤ نموذج "اللحم المتوهج" لبروتين m y ohaemerythrin ، وتظهر المناطق الأكثر قابلية للاستضداد والتحرك في البروتين بالألوان الخفيفة.

التطبيقـات المحتمـلة

Potential applications

تعززت قيمة مولدات المناعة الببتيدية بدرجة كبيرة لقدرتها على توليد مجموعة أجسام مضادة،يتفاعل البعض منها مع البروتين الأصلي ويتفاعل البعض الآخر مع الجزيئات غير المطوية، ونتيجة لذلك،يجب أن تكون الأجسام المضادة مفيدة فى كل اختبار تقريباً للكشف عن بروتينيات معينة.

تحليل بروتينات معينة

Analysis for specific proteins

لطريقة الببتيد المستمنع وجهين يجعلان منه مفيداً بصفة خاصة ، الوجه الأول،هو أن المطلب الوحيد الأساسى لصنع أجسام مضادة تتفاعل مع بروتين معين،هو تسلسل الحمض الأمينى للبروتين، ويعتبر هذا المطلب مهماً جداً هذه الأيام،لأنه يتم الحصول على معظم تسلسلات الأحماض الأمينية بواسطة تبديل التسلسلات النكليوتيدية من الجينات المناظرة، وفى الواقع،فأحياناً ما يكون الشيء الوحيد المعروف عن منتج جينى متعارف عليه هو تسلسل حمضه الأمينى، فى حين أنه يمكن تخليق الببتيدات المناظرة لأجزاء من هذا التسلسل بطريقة كيميائية واستخدامها فى توليد الأجسام المضادة التى يمكنها القيام بعمل المجسات لتحديد البروتين فى الخلايا.

بالإضافة إلى أن الأجسام المضادة تتعرف على منتجات الجينات البربوتينية، فإنه يمكن استخدامها فى اختبار الوظيفة البيولوجية للبروتينات عن طريق تحديد مواقعها الخلوية وتحليل أنشطتها الإنزيمية المحتملة فى أنبوبة الاختبار، والأجسام المضادة مفيدة أيضاً فى تنقية البروتينات بواسطة التحليل الكروماتوجرافى بالتآلف المناعى immunoaffinity chromatography، وفى هذا النوع من الكروماتوجرافية ،فإن الأجسام المضادة التى تتعلق ببعض أنواع الدعامات الصلبة ترتبط بشكل محدد بالبروتين التى تتعرف عليه،ونتيجة لذلك تزيله من خليط معقد مثل خلاصة الخلية، ويمكن أن تزال البروتينات المرتبطة بصورة محددة بسهولة من الأجسام المضادة بواسطة كميات كبيرة من الببتيد

لمحصن الأصلى، وغالباً ما يمكن بهذه الطريقة، استخلاص إنزيمات فى صورة نشطة.

والوجه الثانى لطريقة الببتيد المستمنع،هى أن الأجسام المضادة تتفاعل مع منطقة صغيرة من البروتين يمكن للقائم بالاختبار أن يختارها مقدماً ،حيث يختار الببتيد المستخدم لتوليد الجسم المضاد، ويمكن أن يقال أن للأجسام المضادة تخصصات سابقة التحديد أو سابقة الاختيار، وفى بعض الدراسات التى يكون فيها الكشف عن البروتين هو الهدف الوحيد،لا يكون الموقع الذى سترتبط فيه الأجسام المضادة بذى أهمية، ولكن فى بعض الدراسات الأخرى،يعتبر توجيه الأجسام المضادة إلى مركز صغير معين شيئاً أساسياً .

وعلى سبيل المثال،ففى الدراسات التى ذكرناها من قبل عن تخليق البروتينات الغلافية لفيروس مولونى سرطان الدم الفأري Moloney leukaemia ،فإن تحديد الخطوة التى تنشق فيها قطعة الكربوكسيل الأخيرة للأصل p١٥E،ستكون صعبة جداً فى غياب الأجسام المضادة التى تتفاعل بصورة محددة مع هذا الجزء من البروتين البشير ، وتعد الأجسام المضادة المستهدفة كواشف ممتازة لتتبع مصير جزء معين من بروتين خلال مسارات التصنيع، من أجل تتبع أى التسلسلات المشفرة من الجينات ستستخدم عندما تكون الاختيارات البديلة ممكنة،كما فى حالة الجينات المعاد ترتيبها التى تشفر بنفسها عن بروتينات الجسم المضاد ، ومن أجل إنتاج الأجسام المضادة التى يمكنها التمييز بين البروتينات وثيقة الصلة .

واستخدام الببتيدات كمولدات مناعة قد يكون الطريقة الأكثر عملية والأسهل لصنع أجسام مضادة معينة بكاملها، تستطيع أن تميز بين بروتينات وثيقة الصلة

، فالمستضد Thy-١ الذى يحمل على جميع الخلايا اللمفية T يعتبر مثالاً ينطبق على ذلك، حيث يوجد هذا المستضد فى صورتين لا تختلفان عن بعضهما إلا فى حمض أمينى واحد فقط من جملة ١١٢ حمضاً أمينياً، ويعتقد أن الصورة المسماة بـ Thy-١,١ بها فضلة أرجنين فى الموضع ٨٩، فى حين يعتقد أن الصورة Thy-١,٢، بها فضلة جلتامين فى هذا الموضع، ولما كان البروتينان لا يختلفان عن بعضهما إلا فى حمض أمينى واحد ،فهما يقدمان أسلوب جيد لاختبار ما إذا كان يمكن للأجسام المضادة المضادة للببتيد أن تميز بين البروتينات وثيقة الصلة .

وقامت هانا ألكسندر Hanna Alexander وزملاؤها فى مجموعة ليرنر بتخليق ستة ببتيدات،ماثلت أربعة منها المواقع الثابتة لـ Thy-١,١ و thy-١,٢، وشغل الببتيدان الآخران الموقع من الحمض الأمينى ٧٩ إلى ٩٨، وكان لأحدهما أرجنين فى الموضع ٨٩، كما فى Thy-١,١، وكان للآخر جلوتامين فى الموضع ٨٩ كما فى Thy-١,٢، وتفاعلت أجسام مضادة للببتيدات من المناطق المحجوزة للبروتينات مع Thy-١,١ و thy-١,٢، فى حين لم تتفاعل الأجسام المضادة للببتيدات التى شغلت المنطقة المتغيرة إلا مع المتغير المتنبأ به ، وبتوجيه الأجسام المضادة للمنطقة المختلفة ،استطاع الباحثون إنتاج أجسام مضادة محددة لمتغيرات من Thy-١، كان سيصعب الحصول عليها بالطرق التقليدية.

أجسام مضادة تسلك سلوك الإنزيمات

Antibodies that behave like enzymes

قد يصبح من الممكن جعل التخصص المقرر من قبل للأجسام المضادة المضادة للببتيد anti-peptide antibodies يتقدم خطوة للأمام،وصنع أجسام مضادة ترتبط بنفس التركيبات فى البروتينات مثل الإنزيمات، وقد تعتمد الكفاءة الحفزية للإنزيمات على قدرتها على تثبيت بعض حالات عالية الطاقة -حالات العبور كما يطلقون عليها- لجزيئات الركائز ، وقد تقوم الأجسام المضادة التى تتعرف على نفس هذه الحالات بوظائف حفزية، وفى هذه الحالة،فقد يعمل المخزون المناعى من الجسم المضاد كمصدر لأى نوع من الإنزيم،شريطة أن تكون ركيزة الإنزيم موجودة بقدر كاف حتى تكون مستمنعة.

وهناك دافع حقيقى لاختبار هذه الأفكار لأنه،مع وجود القدرة الحالية لصنع أجسام مضادة لأى موضع تقريبًا على بروتين،فالنجاح سيكون مساويًا لكونه قادرًا على إنتاج الإنزيمات تشطر البروتينات فى مراكز محددة ، هذه الإنزيمات ستشبه إنزيمات القطع التى تقطع الـ د.ن.أ عند مراكز محددة ،فيما عدا أن تخصص الإنزيمات التى تؤثر على البروتينات يمكن أن يختارها القائم بالتجربة.

ولكن كيف يمكن القيام بذلك؟ إحدى هذه الطرق قد تكون مبنية على فرض أن الأجسام المضادة المضادة للببتيد،تعمل من خلال آلية ملاءمة مستحثة،وبذلك تشوه الموقع التى ترتبط به ، فإذا توفرت طاقة إضافية،فقد ينشطر البروتين عند مركز الارتباط، وتقوم استراتيجية بديلة بجعل الأجسام المضادة تتوسط فى

التفاعل المحفز لجعل التوازن يكون فى صالح الانشطار المتحلل مائياً للرابطة الببتيدية، والأساس ،حينئذ، هو واحد من الحفز الاستمناعى.

ولاختبار ما إذا كان الحفز الاستمناعى ممكناً،حاول ألفونسون ترامانتانو Alfonson Tramantanoوكيم ياندا Kim Janda وليرنر Lerner،الحصول على أجسام مضادة أحادية الاستنساخ لمادة تحاكى تركيب حالة العبور فى التحلل المائى لأستر، وقام الباحثون بتحصين الفئران بأستر،صمم لكى يكون نظيراً ثابتاً لحالة العبور لحلمأة أسترات كربوكسلية، وعزلوا الأجسام المضادة الأحادية الاستنساخ التى يمكن أن ترتبط بالنظير، واختبرت بعد ذلك الأجسام المضادة من أجل قدرتها على حلمأة أستر ، وعجلت ثلاثة منها معدل حلمأة الأستر بمعاملات تصل ما بين ٣١٠ إلى ٤١٠.

وفى تطور مشابه، بدأ بيتر شولز Peter Schulz وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا فى بركيلى بجسم مضاد موجود مسبقاً وأظهروا أنه يمكن أن يحفز على حلمأة مركب يشابه من حيث التركيب مستضد الجسم المضاد.

وتوضح هذه النتائج جدوى الحصول على أنشطة إنزيمية من تخصصات استمناعية، ويمكن أن تكون تطبيقات هذه الطريقة فى كيمياء البروتين والكيمياء الحيوية والطب تطبيقات هائلة ، وعلى سبيل المثال، فبدلاً من هندسة الجهاز المناعى لإنتاج أجسام مضادة ترتبط بسهولة بالفيروسات أو المستضدات الورمية،فقد يكون من الممكن إثارة أجسام مضادة تخمد نشاط الفيروسات أو تقتل الخلايا الورمية عن طريق التحفيز على انشطارات بروتينية معينة، وسوف تعمل الأجسام المضادة فى الأساس بطريقة مباشرة دون اعتمادها على مساعدة عوامل أخرى مثل بروتينات النظام المتمم، وبغض النظر عما إذا كانت هذه

التصورات صحيحة بالتفصيل،فإن الأجسام المضادة ذات تخصص سابق تحديده، قد تتخذ قريباً أدوارا تتجاوز وظائف ارتباطها البسيطة .

التطبيقات الطبية للأجسام المضادة المستجلبة بالببتيد

Medical applications of peptide-elicited antibodies

وقد يمكن أيضاً استغلال تخصص الأجسام المضادة المستحثة بالببتيـد فـى الكشف عن الأمراض البشرية وعلاجها والوقاية منها، وقـد تشـكل الأجسـام المضادة الأساس لنظم التشخيص المناعية للكشف عن وجود الكائنات العضوية الممرضة أو أجسام مضادة للكائنات الممرضة فى عينات إكلينيكية، وقد اعتمدت التشخيصات المناعية لأمراض مثل الدرنtuberculosis فى أغلب الأحوال على مستحضرات بسيطة نوعاً لمستضدات من كائنات ممرضة. ولا يعتبر زراعـة كميات كبيرة من هذه الكائنات الممرضة والتعامل معها خطراً فحسب،والتى كان يتطلبها إنتاج كميات مفيدة إكلينيكيا من المستضدات ، لكنه كان يصعب وضـع معيار للتفاعلات من عبوة لأخرى. وأيضاً، لم تكن تسمح غالباً المستحضرات البسيطة للمستضدات بالتمييز بين عدوى الكائنات الممرضة وثيقة الصلة.

وعلى سبيل المثال،يستخدم اختبار درن الجلد للكشف عن الدرن،الذى تسـببه عدوى عصـية الـدرن الفطريـة Mycobacterium tuberculosis، والـدرانين Tuberculin(مادة تحتوى بروتين بكتيريا الدرن) هو مرسب حمضـى لعصـية الدرن الفطرية التى تم الاحتفاظ بها فى مزرعة لعدة أسابيع، وعندما تحقن هذه المادة المستضدية فى الجلد،فإنها تستحث على تفاعل منـاعى يتسـم بـالحمرة والتورم فى المنطقة المحقونة فى الأشخاص الذين تعرضـوا مـن قبـل لهـذه البكتيريا.

بيد أن فائدة الدرانين محدودة، لأنه لا يميز بين اســتجابات حــدثت بســبب تعرض سابق لعصية الدرن الفطرية واستجابات سببها التعرض لبكتيريــا مــن نفس عائلتها، وفى بعض مناطق من العالم،ربما تنتج نسبة تصل إلى ٣٠% من تفاعلات الدرانين الموجبة بسبب التعرض لأنواع أخرى من البكتيريا الدرنيــة ،مثلM.intracellulare أو M.fortuinm وليس بسبب التعرض لــعصية الــدرن الفطرية .

وسوف يساعد مستضد أكثر تخصصاً لاختبار الجلد فى الكشف عن الدرن بدقة كبيرة ، وقد يكون اختبار الجلد هذا مبنياً على اســتخدام كواشــف الببتيــد التخليقية التى يمكن تحديدها بطرق كيميائية ويسهل وضع معايير لها، وقامــت مجموعة ليرنر بتخليق ١٣فضلة ببتيدية تماثل فى التسلسل جزء من بروتين من عصية الدرن الفطرية ،الذى له وزن جزيئى ١٠٠٠٠. ويمكن استخدام الببتيــد كمستضد اختبار للجلد للكشف عن البكتير فى حيوانات التجارب،وقد ثبت أنه من أكثر الاختبارات تخصصاً فى هذا المجال عن الدرانين .

وقد يمكن أن تشكل الببتيدات والأجسام المضادة التى تستحث عليها الببتيدات أيضاً الأساس فى الاختبارات المناعيةimmunoassays للكشف عن العدوى، وقد يكون من الممكن هنا استغلال الحساسية الفائقة لهذه الأجسام المضادة فى التمييز بين الكائنات الممرضة من نفس العائلــة ،مثــل الأنمــاط المصــليةserotypes لفيروس، والأنماط المصلية هى أنواع مختلفة من الفيروس التى تكتشف لأنــه ينشأ عنها استجابات جسم مضاد مختلفة نوعاً ما فى الأفراد المصابين بالعدوى، وعلى سبيل المثال،توجه الأجسام المضادة المحايــدة لفيــروس التهــاب الكبــد الوبائيB أساساً ضد المستضد السطحى المسمى بــــHbsAg، وهذا البــروتين

يحمل أيضاً العلامات الثلاث التى تحدد الأنماط المصــلية الأربعــة المحتملــة للفيروس،اثنان منهما من نوعd (adwو adr) واثنان من النـــوعy (ayw وayr)، وقد أوضحت دراسات عديدة أن المستضدات السطحية من الأنمــاط المصــليةy وd،يمكن أن تختلف عن بعضها فى حمضين من جملة ٢٢٦ فضلة حمضاً أمينياً من تسلسل الـــــHbsAg.

ولإنتاج أجسام مضادة يمكنها التمييز بين بروتينين لا يختلفان عن بعضــهما إلا اختلافاً قليلاً،سيكون صعباً تماما إذا استخدمت الأســاليب التقليديــة، ومــع ذلك،يمكن بواسطة مولدات المناعة الببتيدية توجيه الأجسام المضادة إلى المنطقة التى تحتوى على أحماض أمينية رئيسة مختلفة ، وقد تم تخليق ببتيدان الفضلة – ١٣،لكى تناظر إما التسلسل المحدد-y أو-d. ولم تتفاعل الأجسام المضادة التــى يولدها "ببتيد–y" إلا مع مستضد سطحى من فيروس من النمط المصلى y،ولــم تتفاعل الأجسام المضادة التى حفزها "ببتيد–d" إلا مع المستضد الســطحى مــن فيروس النمط المصلى–d، وقد تشكل هذه الببتيدات الأساس لاختبار مناعى مفيد إكلينيكياً للنمط المصلى لالتهاب فيروس الكبد الوبــائيB، وتشــمل المميــزات المحتملة لاختبار من هذا النوع على السهولة التى يمكن بهــا إنتــاج الأجســام المضادة المحددة النمط المصلى،دون الحاجة إلى استخدام الكائن الممرض نفسه، والوفرة المتاحة من الببتيد التخليقى كتحكم إيجابى ثابت.

أحد التطبيقات الأكثر إثارة المحتملة لمولدات المناعة الببتيدية،تأتى من إنتاج اللقاحات الآمنة والمحددة كيميائياً للوقاية من الأمراض، ويمكن صنع لقاح كهذا دون الحاجة إلى زراعة أو معالجة كميات كبيرة من العامل الممرض،كما هــو مطلوب حالياً لإنتاج معظم اللقاحات التقليدية،وسوف يخلو اللقاح من أى تلــوث

بيولوجى، وعلاوة على ذلك، تحظى الببتيدات بثبات رائع فى درجة حرارة الغرفة،تلك الصفة التى ستكون مفيدة على وجه الخصوص فى الدول النامية،التى يمكن أن تظهر فيها مشكلة تبريد عند تخزين اللقاحات.

وعلى الرغم من أن لقاحاً ببتيدياً لم يأخذ طريقه حتى الآن للتطبيق الإكلينيكى،إلا أن العديد منها قد أثبت آمالاً مبشرة إما فى زراعة الأنسجة أو فى النماذج الحيوانية، وتشمل هذه اللقاحات الببتيدية على ببتيدات يمكن أن تضفى بعض مستويات من الوقاية المناعية ضد التهاب الكبد الوبائيB و الحلاء البسيط وسرطان الدم الخبيث ،وأمراض القدم والفم وفيروسات شلل الأطفال وداء الكلب،وأيضا ضد السلالة المسببة للإسهال من بكتيريا أ.كولاى، و ضد الملاريا الطفيلية.

والعمل مع فيروس التهاب الكبد الوبائيB،المسبب لمصل التهاب الكبد الوبائى،يوضح جهود استخدام الببتيدات التخليقية فى اللقاح، وتتصف العدوى بهذا الفيروس بالتهاب شديد للكبد،ويصاب به أكثر من ٢٠٠مليون شخص فى أنحاء العالم، وعلاوة على ذلك، كانت العدوى بهذا الفيروس فى فترة مبكرة من العمر،ترتبط بقابلية حدوث سرطان الكبد فى مرحلة الصبا.

والأجسام المضادة المحايدة،التى ترتبط بفيروس،وبذلك تؤدى إلى تدميره، هى الأجسام المضادة المهمة للوقاية المناعية، وكما ذكرنا من قبل،فمعظم الأجسام المضادة المحايدة لالتهاب الكبد الوبائيB،يتم توجيهها ضد المستضد السطحى، وقد يكون التغير فى هذه الأجسام المضادة سبباً لتغير النمط المصلى فى الاستجابة المناعية لالتهاب فيروس الكبد الوبائيB.وعلى أساس هذا الافتراض،بحثت مجموعة ليرنر مع مجموعة جون جيرن فى مدرسة الطب

بجامعة جورج تاون بواشنطن ومقاطعة كولومبيا،فيما إذا كان يمكن للببتيــدات التخليقية التى تماثل منطقة النمط المصــليd/y أن تضــفى الوقايــة المناعيــة للشمبانزى التى اختبرت عن طريق الإصابة بفيروس التهاب الكبد الوبــائيB؟ فالتحصين ببتيد يحتوى على ٢٨حمضاً أمينياً،تشغل التسلسل المخصص للــنمط المصليy، نشأ عنه حماية جزيئية أو كلية للشمبانزى التى أصــيبت بفيــروس النمط المصليy، وتدل هذه النتيجة بالإضافة إلى النتائج الأخرى من الكائنـــات الممرضة المذكورة سابقاً، على أن ببتيداً قصيراً يكون فى استطاعته منح حماية مناعية ضد مركب عامل ممرض وكبير.

بيد أنه ، لما لم تحدث حماية جزئية إلا فى عدة حيوانات،فإن النتائج توضح أيضاً،أنه يجب تعلم الكثير عن كيفية إحداث أفضل استجابة وقائية من مولــدات المناعة ، وتتعلق الأسئلة التى يجب أن تدرس بالببتيد الأكثر فاعليــة والــدواء المساعف المستخدم والأسلوب المثالى لإعطاء اللقاح للمريض، ويجرى متابعــة الإجابات عن هذه الأسئلة فى عددا من المعامل فــى العــالم ،فــى محــاولات للحصول على درجة كفاية اللقاح المطلوبــة للتطبيقــات الإكلينيكيــة الواســعة الانتشار.وعلى الرغم من أن تخصص الأجسام المضادة التى تستثيرها الببتيدات التخليقية تعتبر ميزة فى بعض التطبيقات،إلا أنها تثير بعض الأسئلة عن فائــدة اللقاحات الببتيدية على أسس عالمية النطاق. فتغير حمضين أمينيين فى المنطقة المستهدفة من المستضد السطحى لالتهاب الكبد الوبائيB،يبدو أنها قادرة علــى إحداث تحويل نمط مصلى،ويحتمل نتيجة لذلك أن تمكّن الفيروس مــن تجنــب تدميره بواسطة الأجسام المضادة المحايدة المحددة للنمط المصلى. ودائمــاً مــا يوجد التغير الوراثى فى طائفة ممرضة،وقد يعطى تحصين البشر بأعداد كبيرة

جداً بالببتيد المحدد لنمط مصلى قوة اختيارية إيجابية لظهــور أنمــاط مصــلية أخرى،وكنتيجة لذلك يجعل اللقاح أقل فاعلية.

إلا أنه يمكن التغلب على هذه المشكلة،إما عن طريق تضمين ببتيدات مناظرة لكل الأنماط المصلية المحتملة فى الفيروس،أو بتوجيــه الببتيــدات والأجســام المضادة إلى مواقع مهمة وظيفياً من البروتين ،ومن ثم تكون أقل احتمــالاً لأن تتطفر، وبالنسبة لفيروس التهاب الكبد الوبائيB،فقد يكفى لقاح محتــوى علــى ببتيدات مناظرة للأنماط المصليةyو d للحماية من هــذا الفيــروس،لأن كــل المستضدات السطحية لفيروس التهــاب الكبــد الوبــائيB،إمــا مــن الــنمط المصليyأو d.

وبالنسبة للفيروسات التى تظهر قدراً كبيراً من تغير الــنمط المصــلى،مثل الفيروس الذى يسبب مرض القدم والفم،فقد يكون تضمين كل المتغيرات الممكنة مجدياً، وبالنسبة لهذه الكائنات الممرضة،فقد يكون من الأفضل التركيز بدلاً من ذلك على التسلسلات المحفوظة بين الأنماط المصلية العديدة، ويحتمل أن تشمل هذه التسلسلات على مناطق الجزيء المهمة وظيفياً التــى لا تســتطيع تحمــل التغير،وقد تصنع لهذا السبب أهدافاً مناسبة للأجسام المضادة المحايــدة.وعلــى سبيل المثال،حاول روبرت نيوراتRobert Neurath وزملاؤه فى مركــز الــدم بمدينة نيويورك توجيه أجسام مضادة مضادة للببتيد لمنطقة محفوظــة ومهمــة وظيفياً لفيروس التهاب الكبد الوبائيB، والمستضد السطحى للفيروس يشفر عنه جينenv ،الذى يمكنه أن يحدد قرابــة ٤٠٠حمــض أمينــى، وتشــكل الــــــ ٢٢٦حمضاً أمينياً فى النهاية الكربوكسلية لهذا التسلســل المستضــد الســطحى الناضج،ويسمى التسلسل المشفر المناظر بمنطقةS أو بجينS، ويسمى د.ن.أenv،

الذى يسبق جينS،بالتسلسل أو الجين السابق لـــS، ويوجد البروتين السابق لـــS فى جزيء الفيروس المعدى،ويظهر أنه يستخدم فى ربط الألبـــومين المتبلمـــر بالفيروس. وهناك افتراض بأن هذا الموقع الرابط يلعب دوراً فى ربط الفيروس بخلايا الكبد،والذى يعتبر ضرورياً لحدوث العدوى .

وهناك ببتيداً يتكون من ٢٦حمضاً أمينياً من النهاية الأمينية للبروتين السابق لــــS،يحتوى على محدد مستضد سائد للبروتين والفيروس، وتكتشف الأجسام المضادة لهذا الببتيد مبكراً خلال دورة عدوى فيروس التهاب الكبد الوبائيB فى البشر،وقد يقدم الأساس لاختبار مناعى لتشخيص مصل التهاب الكبد الوبائى.

وعندما يستخدم الببتيد المحتوى على ٢٦ حمضاً أمينياً كمستمنع،فإنه يستثير أجساماً مضادة ترتبط بالبروتين السابق لـــS، وتمنع ارتباط جزيئات الفيـــروس بالألبومين المتبلمر. وتوحى هذه النتيجة بأن الببتيدات قد تصبح قـــادرة علـــى التدخل مع الفيروس المرتبط بخلايا الكبد،وتمنع بالتالى المرحلة الأولـــى مـــن العدوى، ويمكن أن يمنح تحصين الشمبانزى بالببتيد حماية مناعية ضد تحد قادم من فيروس التهاب كبد وبائيBخبيث.

ويمثل الببتيد السابق لـــS محدد مستضد يشترك فيه جميع فيروسات التهـــاب الكبد الوبائيB،بحيث أنه يجب أن يمنح التحصين بالببتيد حماية ضد أى نمـــط مصلى من الفيـــروس أساســـاً، وعـــلاوة علـــى ذلك،فـــإذا غيـــر الانحـــراف الوراثيgenetic drift التسلسل المستهدف فى الفيروس بحيث لا تستطيع الأجسام المضادة المتولدة من الببتيد أن ترتبط به بعد ذلك،فقد يتغير التسلسل تماماً إلـــى الدرجة التى لا يستطيع بعدها أن يرتبط بخلايا الكبد أيضاً، وبمعنـــى آخر،فقـــد

تظهر الطفرات التى تنجو من مراقبة المناعة،عن طريق تغيير تسلسل الحمض الأمينى للموقع الببتيدى السابق لــS،أنها غير معدية.

الخـــلاصــــــة

أصبحت الببتيدات والأجسام المضادة التى تحفز عليها الببتيدات أدوات بحث مهمة لعالم البيولوجيا الجزيئية وكيميائى البروتين،بالرغم من بعــض المقاومـــة الأولية من جانب المجتمع المناعى لقبول المستضدات الببتيدية،كطريقـــة عامـــة لإنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، فتأثير هذه الكواشف على جهود البحث الأساسية مستمر فى النمو،بشهادة الزيادة السنوية فـــى حجـــم الأبحـــاث المنشورة التى تستخدمها بإحدى الطرق، وتقدم الببتيدات والأجسام المضادة التى تحفز عليها،مفاهيم مهمة عن تركيب البروتينات فى محاليلهـــا والعلاقـــة بـــين تركيب البروتين ووظيفته.

وقد فتحت الكواشف أيضاً طرق جديدة لدراسة وظائف الجهاز المناعى، فهى تستطيع المساعدة على تحديد الطبيعة الكيميائية الدقيقة للمحددات التى تتعـــرف عليها الخلاياT،والتغير المناعى والاستضادى،وهى آلية التحمل المناعى،وتنظيم الاستجابات المناعية، بالإضافة إلى ذلـــك،يجرى اســـتخدام الببتيـــدات حاليـــاً كمستمنعات لإنتاج الأجسام المضادة الأحادية الاستنساخ، وبهذه الطريقة،يجرى ضم التكنولوجيتين للحصول على إنتاج سهل لكميات كبيرة من الأجسام المضادة النقية التى تتفاعل مع أهداف محددة بدقة ومختارة مسبقاً .

ويمكن تخليق الببتيدات فى المعمل بسهولة،ومن السهل نسبياً، إنتاج الأجسام المضادة المتفاعلة مع البروتين، ومع ذلك،يصعب استخدام الـنظم المسـتخدمة لتوليد الأجسام المضادة فى معمل الحيوانات على وجه العموم فى تحصين البشر أو الحيوانات الأليفة، ونتيجة لذلك،يجب الإجابة عن عدد من الأسئلة قبل تطبيق تكنولوجيا التحصين لمنع الأمراض المهمة إكلينيكياً، وتتعلق هذه الأسئلة بتصميم الببتيد الأكثر فاعلية،واختيار الحامـل المثـالى والمسـاعد وتحديـد جرعـات اللقاح،وعمل جداول وطرق لإعطاء الدواء والتى تعتبر أساسـية للوقايـة مـن المرض.

ويجب أن تؤخذ فى الاعتبار أيضًا، قدرة الببتيدات على إحداث الاسـتجابات المناعية المناسبة لتوفير الحماية ،وتأثير الجينات العديـدة التـى تـنظم هـذه الاستجابات، ومع ذلك،ولما كانت مولدات المناعة الببتيدية تظهر سمات لقـاح مثالى مثل التخصص والثبات وسهولة التصنيع،وقلة احتمال تلوث بيولوجى فإن الأسئلة تلقى أولوية كبيرة فى المعامل البحثية فى مختلف أنحاء العالم، ويمكـن توقع تقدم كبير نحو تحقيق هدف لقاح مفيد إكلينيكياً ذى أساس ببتيدى على مدى السنوات القليلة القادمة ، ومن الاحتمالات المبشرة بالأمل،تلـك الاسـتخدامات الممكنة للكواشف الببتيدية للتشخيص المناعى للمرض.

وهذا الهدف يعد الأقرب فى الوصول إليه عن لقـاح،ويمكن توقـع اختبـار مناعى ذى أساس ببتيدى فى غضون السنوات القليلة القادمة.

الفصل الرابع عشر

طـــرق جديـــدة لتشخيص الأمـــراض الوراثيـــة

New methods for the diagnosis of genetic diseases

أحدثت تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعم تغييرًا جوهريًا فى دراسة الأمـــراض الوراثية البشرية، والعديد من هذه الأمراض سببها طفرات جينية نشـــأت إمـــا بسبب الغياب الكامل لمنتج بروتينى وظيفى ،أو بسبب وجود بروتين معيب لا يعمل على الوجه الصحيح ، وتقدم تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ المطعم طرق جديـــدة للكشف عن هذه الآفات الوراثية، وبذلك تتيح تحديد دقيق وحصـــر موضـــعى لهذه العيوب التى تسبب الأمراض الوراثية، وكنتيجة لذلك، فـــإن العديـــد مـــن الحالات يمكن أن تشخص فى الجنينfetus فى مرحلة مبكرة من مراحل الحمل، وعلاوة على ذلك، فالحالات الحاملة للأمراض التى لم يكن فى الإمكان اكتشافها من قبل لبعض التشوهات الوراثية يمكن التعرف عليها حاليًا، وكانت النتيجة أن أمكن إطلاع آباء المستقبل على الاختيارات الوراثية فيما إذا كانوا يرغبون فـــى بدء حمل أو استمراره.

وبالنسبة للأمراض التى لم يعرف بعد طبيعة عيوبهـــا الوراثيـــة ومواقعهـــا المحددة،فإنه يجرى اســـتخدام طـــرق الـــــ د.ن.أ المطعـــم لتحديـــد المواقـــع الكرموسومية التى تقع بها الجينات المصابة، وتشمل هذه الأمراض مرض تليف المثانةcystic fibrosis ومرض هنتجتونHuntington's disease، وهناك جهـــود مكثفة جارية للتعرف على الجينات الخاصة التى يدور حولها البحث ، ولن يخدم

هذا مجال التشخيص فقط،لكنه قد يؤدى أيضًا إلى فهم أفضل لأسس الكيمياء الحيوية للحالات، وربما إلى طرق علاج أكثر فاعلية، وأخيرًا،فقد كانت التكنولوجيا على درجة كبيرة من الفائدة لفهم التاريخ الطبيعى للأمراض الوراثية، حيث أتاحت تتبع أصول وهجرات الجينات الطافرة، وتقدير عدد المرات التى ظهرت فيها نفس الآفات الوراثية فى مجتمعات أخرى.

أنيميا الخلية المنجلية والثالاسيميا

Sickle cell anaemia and thalassemia

ظهرت قوة تحليل الـ د.ن.أ واضحة لأول مرة مع مرض الخلية المنجلية ومرض فقر الدم البحر (الثالاسيميا)،وهما من الأمراض الموروثة التى تتصف بإنتاج هيموجلوبين شاذ، وعلى الرغم من وجود العديد من الأمراض الوراثية البشرية المختلفة،إلا أن تلك الأمراض الموجودة فى الهيموجلوبين،تعتبر من بين أهم المشاكل الصحية فى العالم، فالهيموجلوبين، الذى يعتبر البروتين الغالب على خلايا الدم الحمراء، يعمل أساسا على نقل الأكسجين من الرئتين إلى الأنسجة، ويتكون جزيء الهيموجلوبين من أربع وحدات بروتين تحت فرعية ، يحمل كل منها جزيء من الهيم الحامل للحديد،الذى يعمل على ربط الأكسجين، وتسمى سلاسل البروتين بالجلوبيناتglobins.

وهناك ستة أنواع رئيسة من الجلوبينات، سميت بأسماء ألفا وبيتا وجاما ودلتا وأبسيلون وزيتا،وجدت فى الهيموجلوبينات البشرية الطبيعية (جدول١٤-١)، وتنتج هذه الجزيئات الجلوبينية بصورة منتظمة خلال مراحل حياة المضغة والجنين والشخص البالغ، وتنتج المضغة(مرحلة ما قبل الجنين) أولاً جلوبينات

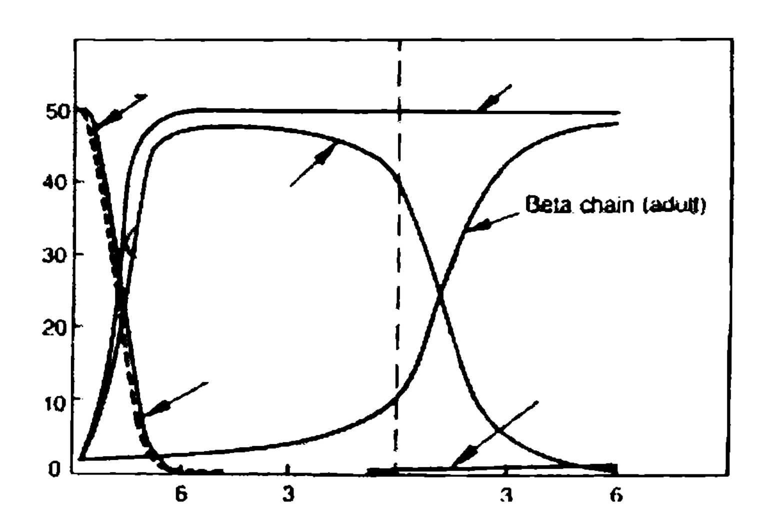
أبسيلون وزيتا،ويتكون جزيء الهيموجلوبين حينئذ من اثنين من كل مـــن هـــذه السلاسل، وفى حوالى الشهر العاشر من الحمل ،يحل محل جلوبينات أبســـيلون وزيتا سلاسل من جلوبين ألفا وجاما ،التى تتحد لتكون الهيموجلـــوبينF،وهـــو الهيموجلوبين الرئيس لحياة الجنين، وقبل موعد الولادة بفترة قصـــيرة،يتناقص إنتاج سلسلة جلوبين جاما ويحل محلها تخليق جلوبين بيتـــا ، ويســـمى النـــوع الرئيس من هيموجلوبين الأشخاص البالغين بـــــHbA،ويتكون من سلستين من سلاسل ألفا وسلستين من سلاسل بيتا، ويوجد أيضًا جلوبين بنســـبة أقـــل فـــى الأشخاص البالغين،وهو HbA٢،والذى يحتوى على سلسلتين من سلاســـل ألفـــا وسلسلتين من سلاسل دلتا ويشكل حوالى ٢,٥% من المجموع(شكل ١٤-١).

جدول ١٤-١ أنواع الجلوبين الرئيسة فى الهيموجلوبين البشرى

الهيموجلوبين	أنواع الجلوبين	الذى ينتجه	نسبته فى الشخص البالغ
A	$\alpha_2\beta_2$	الشخص البالغ	٩٧
A٢	$\alpha_2\delta_2$	الشخص البالغ	٢,٥
F	$\alpha_2\delta_2$	الجنين والشخص البالغ	١ >
Portland I	$\xi_2\varepsilon_2$	المضغة	–
PortlandII	$\xi_2\delta_2$	المضغة	–

ويمكن أن تؤثر التشوهات الوراثية على تخليق أية سلســـلة مـــن السلاســـل الجلوبينية،وبما أن الـــــــ HbA هو الهيموجلوبين الرئيس فى حياة الشـــخص البالغ،فإن الانحرافات التى تؤثر على إنتاج أو تركيب أو وظيفة سلاســـل ألفـــا

وبيتا، يمكن أن تسبب اضطرابات مهمـــة إكلينيكيـــا ، ويمكـــن تقســـيم هـــذه الاضـــــطرابات بشـــــكل عـــــام إلـــــى فئتـــــين : الأمـــــراض الهيموجلوبينيةhaemoglobinopathies،التى تنتج فيها البروتينات الشاذة،كما فـــى حالة مرض الخلية المنجلية،وأمراض الثالاسيميا،والتى إما لا ينتج فيهـــا أحـــد سلاسل الجلوبين على الإطلاق، أو تنتج بكميات غير كافية، ومع ذلـــك يظـــل تركيبها سليم.



شكل ١٤-١ نمط تخليق سلسلة جلوبين أثناء حياة الجنين و ما بعد الولادة.

وتنشأ هاتان المجموعتان من الأمراض بسبب طفرات متنحية،وتورث تبعـــاً لقوانين مندل، ولكى يظهر المرض الوراثى،يجب أن يكـــون الفـــرد متجـــانس

الزيجوت homozygous[1]،وله جينًا معيبًا فى كل من زوج الكروموسوم المعين، وإذا كان كلا الأبوين حاملا متغاير الزيجوتheterozygous،لديه جين طافر فى كرموسوم واحد فقط،فسيصبح لكل طفل فرصة واحد من أربعة لوراثة نسختين من الجين الطافر، ونتيجة لذلك ينشأ مرض أنيميا الخلية المنجلية أو الثالاسيميا، وليست لدى حاملى المرض أعراض واضحة له،بينما يمكن الكشف عنهـــا فـــى اختبارات الدم، وتصيب أمراض أنيميا الخلية المنجلية والثالاسيميا بصفة أساسية شعوب أفريقيا، ومنطقة البحر المتوسط ،والشرق الأوسط، وآسيا.

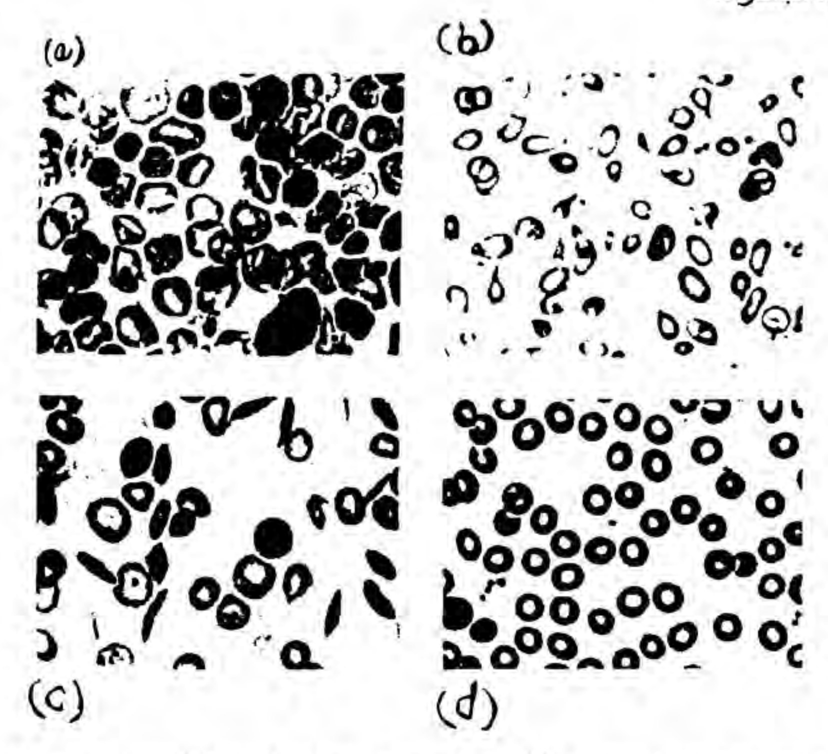
أنيميا الخلية المنجلية

Sickle cell anaemia

من مئات الطفرات التى يمكن إما أن تؤثر على سلاسل هيموجلـــوبين ألفـــا وبيتا، يكون أكثرها أهمية تلك الطفرة التى تسبب مرض أنيميا الخلية المنجلية، ويحدث طفر الخلية المنجلية فى الحمض الأمينى السادس من الـــــ ١٤٦حمضًا أمينيًا التى تشكل سلسلة جلوبين بيتا، ويتغيـــر حمـــض الجلوتاميـــك Glutamic acid،وهو الحمض الأمينى الطبيعى فى هذا الموضع من السلسلة إلـــى حمـــض الفالينValine، نتيجة لتغير قاعدة واحدة فى الكودون ٦مـــن الجـــين المنـــاظر، ويؤدى هذا الاستبدال لذلك الحمض الأمينى الواحد إلى تغيير خصائص جزيء الهيموجلوبين،ويحدث نتائج إكلينيكية خطيرة.

[1]ـــ متجانس الزيجوت أو متجانس اللواقح:فى علم الوراثة،يقال أن أحد الأفراد متجانس اللواقح،بالنسبة إلى صفة معينة،عندما يكون عنصرا المورثتين اللتين تحملان هذه الصفة متشابهتين،والعكس متغاير الزيجوت.(معجم المصطلحات الزراعية للشهابى).المترجم

وعندما يفقد الهيموجلوبين الشاذ أكسجينه فى الأنسجة، فإن جزيئاته تتكــدس مع بعضها مكونة لييفات fibrils، تضفى صلابة على خلايا الدم الحمراء المرنة ثنائية التقعر ،وتشوهها بأشكال تشبه المنجــل(أشــكال ١٤-٢أو١٤-٢ب)، ولا تستطيع الخلايا الانتقال بسهولة خلال الأوعية الدموية الصــغيرة،التى تصــبح مسدودة بالخلايا، ويعانى الأشخاص المصابين ألماً مبرحاً نتيجة الأزمة الحادة والمؤلمة،وتتلف أجهزة الجسم الحيوية،وتحــدث أنيميــا انحــلال خلايــا الــدم haemolytic anaemia، حيث تتحطم الخلايا المنجلية الصلبة فى الدورة الدموية بصورة مبتسرة.



شكل ١٤-٢ خلايا الدم الحمراء لشخص طبيعى (a) ، ولمرضى مصابون بأنيميا الخلية المنجلية(b) ومرضى مصابون بثالاسـيميا بيتا متجانس الزيجوت (c) وألفا- ثالاسيميا متجانس الزيجوت(d)

الثالاسيميا(فقر الدم البحرى)

Thalassaemia

تنقسم أمراض الثالاسيميا إلى مجموعتين رئيسيتن: ثالاسيميا ألفا وبيتا،والتى تخلق تبعاً لها سلسلة الجلوبين بكميات شاذة، ففى الصورة متجانسة الزيجوت من ثالاسيميا ألفا، تكون سلاسل جلوبين ألفا غائبة،ويتكون الهيموجلوبين الأولى فى دم الجنين من أربع سلاسل من نوع جاما،وهو الهيموجلوبين الذى لا يعمل بصورة فسيولوجية فى نقل الأكسجين، وتوجد خلايا الدم الحمراء ناقصة النمو فى الدورة الدموية(شكل ١٤-٢د) وتكون الأجنة فى حالة أنيميا شديدة وتعانى من حالة تعرف بالحبن الجنينيhydrops fetalis،وغالبًا ما تموت خلال الشهور الثلاثة الأخيرة من الحمل أو خلال أيام قليلة من الولادة، والخلايا الحمراء فى الأشخاص المصابين تكون أصغر من مثيلتها فى الأشخاص الطبيعيين،وتحتوى على كميات قليلة من الهيموجلوبين(شكل ١٤-٢ج)، ويتطلب الأمر فى هذه الحالات عمليات نقل دم بصورة منتظمة للحفاظ على تركيزات الهيموجلوبين بنسب كافية، ولتعويض الأنيميا،تتمدد كتلة نخاع العظم فى المرضى،وتمتص الحديد الموجود فى الوجبة الغذائية بصورة شاذة، ويتسبب الامتصاص المتزايد المقترن بالحمل الزائد من الحديد فى ترسيبات ثقيلة من الحديد فى الأنسجة،وإلى تلف العديد من أجهزة الجسم بما فيها القلب والكبد.

وحتى فترة قريبة،كان مرضى ثالاسيميا بيتا بصفة عامة يتوفون أثناء مرحلة الطفولة بسبب الإصابة بالمرض،أو يموتون فى مرحلة البلوغ نتيجة فشل القلب الناجم عن حمل الحديد الثقيل، وقد تحسنت التقديرات المحتملة للإصابة

بالمرض بصورة كبيرة خلال الخمسة عشر عامًا الماضية،كنتيجة للعلاج بنظام تغذية يتكون من عمليات نقل دم متكررة،بالإضافة إلى الحقن اليـومى بعقـار الدفركسامين deferroxamine للتخلص من الحديد من الأنسجة، وتجاوز بعـض المرضى حالياً الثلاثين من أعمارهم.

ويكتمل التشخيص الإكلينيكى لأنيميا الخلية المنجلية أو الثالاسيميا بواسـطة فحص الدم، وفى ظل ظروف من تركيز أكسجين منخفض ،يمكن تمييز خلايـا الدم الحمراء المنجلية بسهولة تحت الميكروسكوب، ويمكن أن تـرى بوضـوح أيضا قطر خلايا الدم الحمراء الصغيرة ومحتوى الهيموجلوبين المتناقص الـذى يميز الثالاسيميا خلال الفحص الميكروسكوبي، ويمكن تأكيد التشخيص من خلال فحص الهيموجلوبين نفسه ، ويمكن تمييز الخليـة المنجليـة والهيموجلوبينـات الطبيعية بسهولة،كما يمكن تمييز التغييرات المميزة فى جلوبينـات مـن نـوع ثالاسيميا ألفا أو بيتا.

تشخيـص مـا قبـل الـولادة

Parental diagnosis

مع استثناءات قليلة ،لا يمكن حاليا تصحيح العيوب الأساسـية للأمـراض الوراثية ، ونتيجة لذلك،توجه معظم طرق العلاج نحو الوقاية أو العلاج المبكـر للمضاعفات الناجمة عن المرض، ففى مرض الخلية المنجليـة، علـى سـبيل المثال،تعتبر الإصابة سبب شائع للوفاة فى فترة الطفولة، ويفضـل التشـخيص المبكر بحيث يمكن إعطاء الأطفال المصابين مضادات حيوية تساعدهم علـى منع الإصابة،والرعاية الطبية عند ظهور أعراض المرض الأولية فـى حالـة

تطور الإصابة، وعلى الرغم من أن نمو وتطور الأفراد المصابين بثالاسيميا بيتا قد تحسن بصورة كبيرة من خلال عمليات نقل الدم والحقن اليومى بعقار دسفروكسامين،إلا أن المرضى يحتاجون برغم ذلك إلى علاج طبى مستمر ، ونقلهم إلى المستشفيات فى حالة المضاعفات.

وإحدى طرق التحكم فى الأمراض الوراثية هى منع إنجاب الأطفال المصابين،حيث يمكن إطلاع أعضاء الأسر الذين لديهم خطر متزايد من الإصابة بمرض وراثى على طبيعة وطرق انتشار المرض،واختبارهم بصورة منتظمة للتعرف على الأشخاص حاملى المرض، ومن خلال هذه المعلومات، يمكن التعرف على الأشخاص الذين هم فى خطر من إنجاب طفل بمصاب بالمرض والتشاور معهم حتى يكونوا على دراية تامة بخيارات الإنجاب، فهم لديهم حق اختيار منع الحمل كلية،أو فى حالة ما إذا كانوا يرغبون فى إنجاب طفل،أن تجرى عليهم تشخيصات ما قبل الولادة، ويجهض الجنين المصاب ، وقد تطورت على مدى العشر سنوات الماضية الاختبارات الآمنة لتشخيص ما قبل مرحلة الولادة لأمراض الخلية المنجلية والثالاسيميا.

تحليل دم جنينى

Fetal blood analysis

كانت المحاولات الأولى لتشخيص ما قبل الولادة لأمراض الخلية المنجلية والثالاسيميا محاولات بسيطة ، ولما كانت الأمراض تظهر بشكل واضح فى الدم،فيمكن الحصول على عينة صغيرة من دم الجنين وفحصها للكشف عن وجود أو غياب الهيموجلوبينات الشاذة، وفى فترة السبعينات،طورت طرق

للحصول على عينات دم من الجنين،وكانت هذه الطريقة الجديدة لتشخيص ما قبل الولادة ناجحة تمامًا، ولا تزال طريقة أخذ عينة من دم الجنين،هى الطريقة الأساسية فى تشخيص ما قبل الولادة لمرض ثالاسيميا بيتا فى بعض الدول الأوربية على الرغم من عيوبها العديدة.

وعادة ما يطبق هذا الإجراء فى فترة متأخرة تمامًا من الحمل - فى حوالى الأسبوع الثامن عشر من الحمل -ولا يتم الوصول إلى التشخيص إلا عند الأسبوع العشرين، فإذا قرر الأبوين إنهاء الحمل حينئذ ،فيجب أن يتم الإجهاض فى أواخر الحمل ،عندما تكون المخاطر الطبيعية على المرأة كبيرة والتأثيرات الفسيولوجية متعاظمة، وعلاوة على ذلك،فإن سحب دم من الجنين ليس إجراء روتينياً،ولا يستطيع القيام به إلا خبراء متخصصين قليلين فى طب التوليد. ويصاحب هذا الإجراء بعض المخاطر على الجنين،تشمل على النزيف والعدوى، على الرغم من أنه يمكن التقليل من هذه المخاطر مع أيدى خبيرة، وفى حالات قليلة من مرض ثالاسيميا بيتا ، لا تتمكن الطريقة المستخدمة فى تحليل دم الجنين من أن تميز بشكل قاطع بين الحالات الحاملة للمرض والحالات المصابة بالمرض.

تحليل الـ د.ن.أ

DNA analysis

منذ فترة الستينات، استخدمت عملية سحب الصاء Amniocentesis (وهى سحب عينة من سائل السلى للفحص) للحصول على أنسجة جنينية لتشخيص عيوب ما قبل الولادة، وفى هذا الإجراء،يتم إدخال إبرة مجوفة خلال الجدار

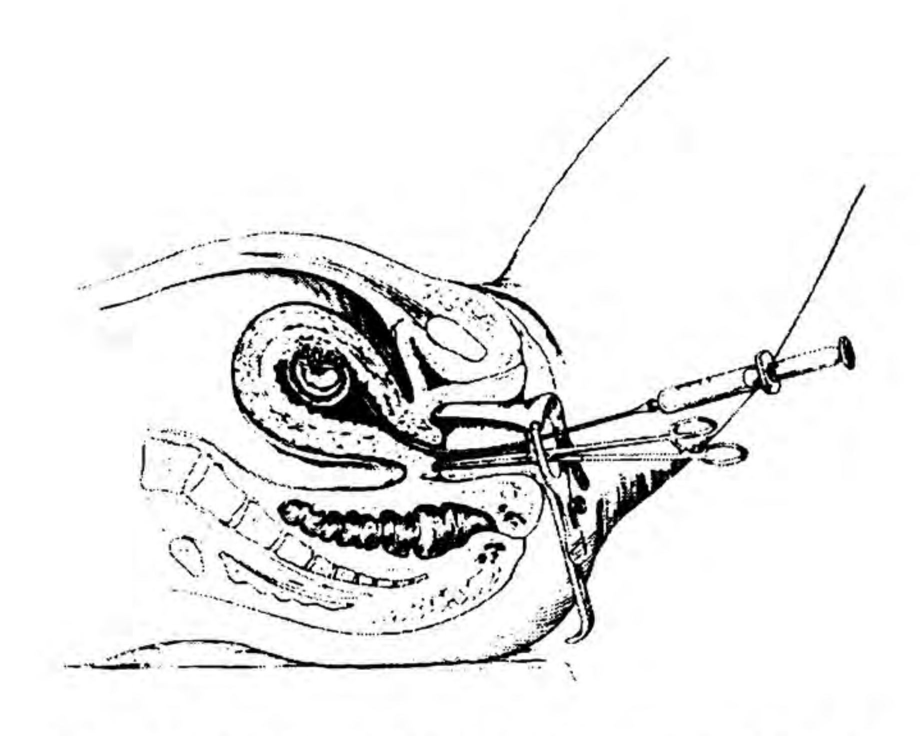
البطنى للمرأة الحامل ومنه إلى داخل السائل الــذى يمــلأ الكــيس الأمنيــونى المحتوى على الجنين، ويمكن سحب عينة من السائل الأمنيونيamniotic fluid، والذى يحتوى على خلايا من أصل جنينى بواســطة إبــرة، وتؤخــذ الخلايــا الأمنيونية من الأمنيون(الغشاء المبطن للمشيمية والمفرز للنخط)،أو جلد الجنين أومن الجهاز التنفسى والجهاز الهضمى الجنينى.

وللكشف عن عيوب كروموسومية،مثل تلك العيوب التى تسبب متلازنة دون Down's syndrome،يجــرى زراعــة الخلايــا فــى مزرعــة،ويتم تحليــل كروموسومات الخلايا المنقسمة، ويعطــى تحليــل إنزيمــات خــلال الجنــين المستزرعة معلومات عن العيوب الإنزيمية الوراثية،مثل نلك العيب الذى يسببه داء تاى ساكسTay-Sachs، ويمكن أن يعطى تحليل المواد الكيميائية فى السائل الأمنيونى معلومات عن وجود بعض التشــوهات المتطــورة، وعلــى ســبيل المثال،ففى حالة الصلب الأشرمspina bifida،وهى الحالة الخطيرة التى لا يتكون فيها العمود الفقرى بصورة طبيعية، يرتفع تركيز ألفا– بروتين الجنينى alpha-fetoprotein فى السائل الأمنيونى، ومع نلك، لا يعطى السائل الأمنيونى خلايــا دم حمراء،ونتيجة لذلك،لا يمكن استخدام سحب الصاء فى البداية لتشخيص أنيميا الخلية المنجلية والثالاسيميا،ولا يمكن استخدامه فى الكشــف عــن الأمــراض الوراثية،التى تكون فيها البروتينات المصابة غير معروفة. وكان مجيء تحليــل الــــ د.ن.أ للكشف المباشر عن الطفــرات الجينية،والــذى تــم فــى أواخــر السبعينات،أن أفسح مجالاً واسعًا لتشخيص ما قبل الولادة.

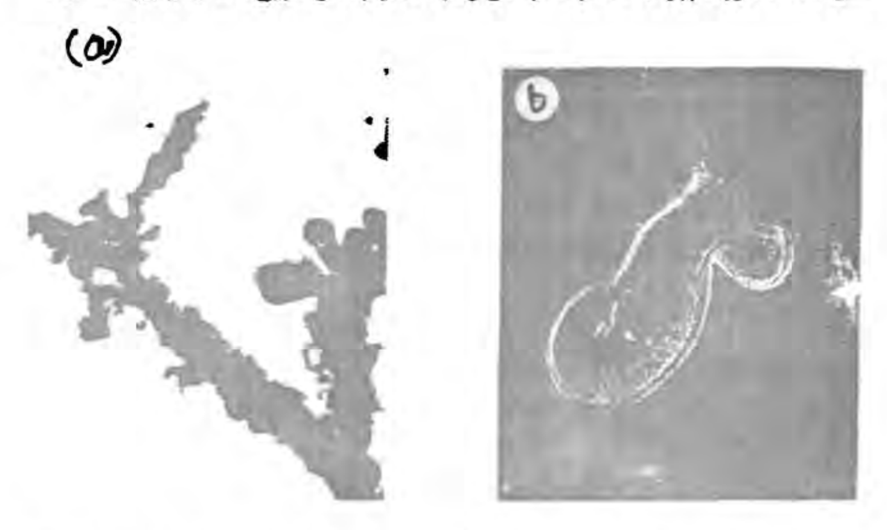
والتطور الآخر الذى ساعد فى هذا المضمار،هو استخدام العينة الحيــة مــن الخمل المشيميchorionic villus biopsy،وهى طريقة جديدة للحصــول علــى للخلايا الجنينية والــــ د.ن.أ ، ولم يكن فى الإمكان تجريــب طريقــة ســحب الصاء إلا بعد الأسبوع الخامس عشر من الحمل،وكان يتطلب زراعة وتحليــل

الخلايا أسبوعان آخرين. وهذا يعنى مرة أخرى،أنه،إذا اختيرت عملية الإجهاض،فكان يجب القيام بها فى أواخر فترة الحمل، وقد جعلت طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى من تشخيص ما قبل الولادة تشخيصًا ممكنًا فى فترة مبكرة جدا من مرحلة الحمل، وغشاء الحميل البرانيchorion،والذى يعتبر غشاء آخر من الأغشية المغلفة للجنين أحد المصادر الجنينية. وتحاط المضغة الأولية ببروزات ميكروسكوبية من غشاء الحميل البرانى التى تسمى بالخملاتvilli أو الزغب(شكل ١٤-٣و١٤-٤). ويمكن جمع القليل من الزغب إما بواسطة العينة الحية أو الجفتforceps،أو عن طريق السحب بقسطرة،للحصول على د.ن.أ لتحليله، ولما كان من الممكن إجراء طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى بين الأسبوع السابع والعاشر من الحمل،ولا تتطلب فترة طويلة لاسترزاع خلية ،فتتيح هذه الطريقة إجراء تشخيص ما قبل الولادة خلال الشهور الثلاثة الأولى من الحمل.

وقد استخدم هذا الأسلوب فى الدول الاسكندنافية فى أوائل السبعينات، وفى الصين وروسيا فى منتصف السبعينات،وقد استعاد نشاطه فى الآونة الأخيرة فى أوروبا والولايات المتحدة، وتدل النتائج الأولية لدراسة جماعية آخذة فى التطور حاليًا فى العديد من المراكز الطبية لتقييم آمان طريقة أخذ عينة حية من الخمل المشيمى على أن مخاطر هذه الطريقة قليلة.



شكل ١٤-٣ طريقة إجراء أخذ عينة حية من زغب المشيمية عن طريق السحب بأنبوبة قسطرة.



شكل ١٤-٤ منظر ميكروسكوبى لزغب الميشيمية مزالة أثناء أخذ العينة الحية(a).وصورة مكبرة لزغبة واحدة(b).

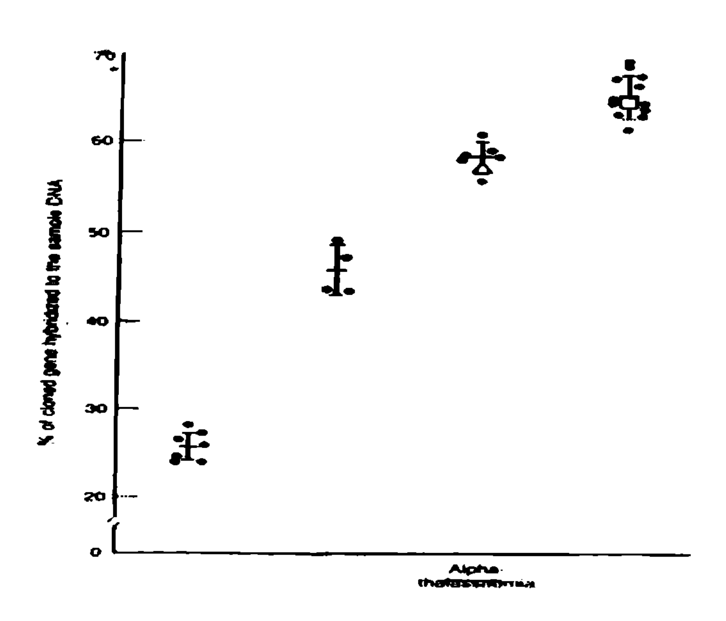
تطور تحليل ال د.ن.أ

Development of DNA analysis

فى عام ١٩٧٦،أصبح ثالاسيميا ألفا أول مرض وراثى يجـرى تشخيصـه بطريقة ناجحة من خلال تحليل الـ د.ن.أ قبل الـولادة، وتتضـاعف جينـات جلوبين ألفا الوظيفية فى البشر،ويصبح لكل فرد أربعة نسخ من الجين فى كـل خلية،اثنان على كل عضو من زوج الكرموسوم١٦، وفى الصورة القاتلة مـن متماثل الزيجوت لثالاسيميا ألفا ،تحذف جميع جينات جلوبين ألفا الأربعـة مـن الكرموسومات، ويمكن إجراء التشخيص بتحديد ما إذا كان الـ د.ن.أ من الخلايا التى تم الحصول عليه بواسطة سحب الصاء، يحتوى علـى أى مـن جينـات جلوبين ألفا .

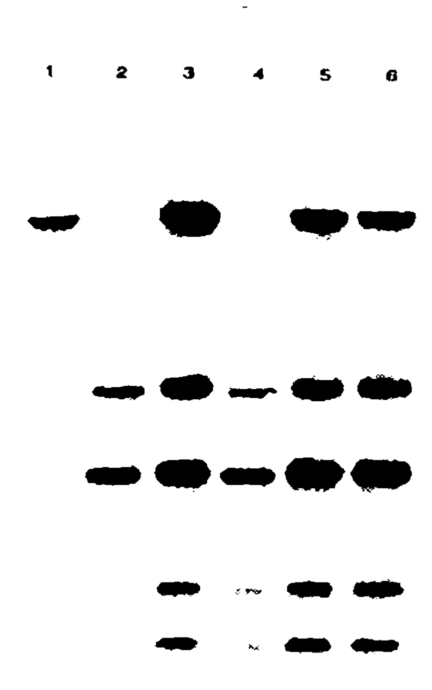
وفى الدراسات الأولية على تشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا ألفا،اسـتخدم يويت واى كانYuet Wai وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيـا بسـان فرانسيسـكو طريقة تهجين تعمل فيها نسخة مشعة من جين جلوبين ألفا كمجس للكشف عـن الجين فى د.ن.أ الشخص، وعندما يخلط المجس المشع ود.ن.أ الشخص معًا فى محلول فإن المجس يلتصق بـ د.ن.أ جين جلوبين ألفا . وفى ظل ظروف بالغة التحكم، تتعلق درجة هذا التهجين فى د.ن.أ الشخص بعدد نسخ جين جلوبين ألفا الموجود،ويمكن بذلك أن تحدد ما إذا كان الفرد له صورة متجانسة الزيجوت من ثالاسيميا ألفا (شكل ١٤-٥). وعلى الرغم من جدوى طريقة التهجين إلا أنهـا صعبة من الناحية الفنية،وتتطلب كميات كبيرة من الـ د.ن.أ،الـذى لا يمكـن الحصول عليه إلا عن طريق استزراع خلايا السائل الأمنيونى لمدة تتراوح مـا بين ثلاثة إلى أربعة أسابيع.

وكان لاكتشـــاف إنزيمـــات القطـــع restriction enzymes(انظـــر الفصـــل الأول)وتطور تحليل بقعة ثاوثرن Southern blot،أن بســـطا إلـــى حـــد كبيـــر تشخيص ما قبل الولادة فى اضطرابات الهيموجلوبين، ويمكن أن تكتشف هـــذه الطرق التغيرات النوعية فـــى الجينـــات،التى تشـــمل طفـــرات النكليوتيـــدات الفردية،بالإضافة إلى التغيرات الكمية فى عدد الجينات التى تنشأ بسبب إلغائها، ويمكن توضيح تطور هذه الطرق من خلال استخدامها فى الكشف عـــن ثلاثـــة أنواع رئيسة من الطفرات فى نظام الجلوبين،أى الأنواع الناشـــئة عـــن ألفـــا- ثالاسيميا ، وأنيميا الخلية المنجلية وثالاسيميا بيتا .



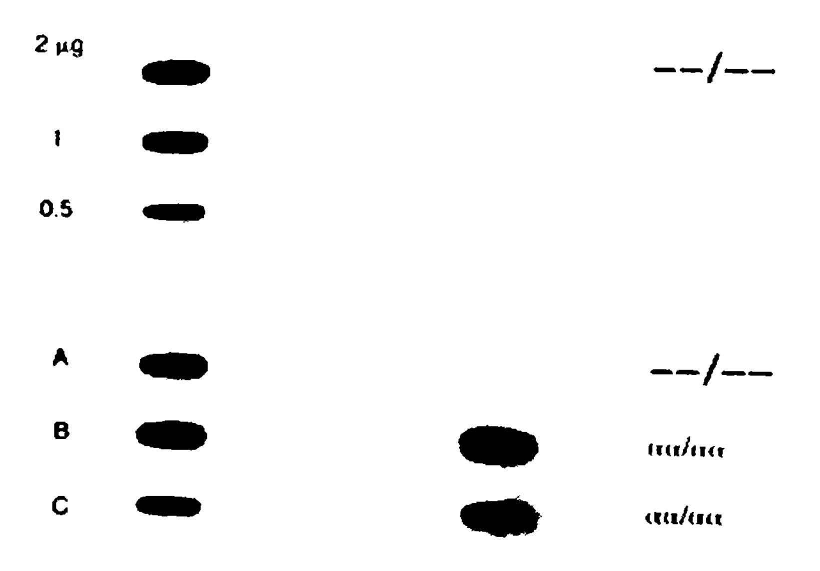
شكل ١٤-٥ قياس عدد جينات جلوبين ألفا عن طريق التهجين مع جين مستنسخ مشع من جلوبين ألفا، وتدل الحارة الأولـى على اليسار على تهجين الـــ د.ن.أ لأشخاص مصابون بالحبن الجنينى،الذين لا يوجد لديهم نسخ من جين جلـوبين ألفـا؛ وتمثـل الحارة الثانية تهجين الـ د.ن.أ لأشخاص مصابون بمرض هيموجلوبينH،الذين لديهم نسخة واحدة من الجين؛وتوضح الحـارة الثالثـة تهجين الـــ د.ن.أ لأشخاص حاملو ثالاسيميا ألفا ، الذين لديهم نسختان من الجين؛ وتبين الحارة الأخيرة على اليمين،التهجين بعينات سليمة من د.ن.أ، لأشخاص لديهم أربع نسخ من الجين.

وقد تم تشخيص ثالاسيميا ألفا بواسطة تحليل بقعة ثاوسرن ،وهى إحدى الطرق المستخدمة على نطاق واسع لتحليل الـــ د.ن.أ، والتى سميت باسم مكتشــفها أدوين ثاوسرن Edwin Southern من جامعة أدنبره، ويجرى هضم عينـــة د.ن.أ جنينية بواسطة إنزيم تقييد ،حيث يقوم بشطرها عند تسلسلات نكليوتيدية محددة، ويتم فصل القطع بعد ذلك بواسطة طريقة الهجرة الكهربية electrophoresis على دعامة من الجل،وتكتشف القطعة المحتوية على جينات ألفا-جلــوبين بواســطة مجس يتكون من جين جلوبين ألفا مشع، والقطعة التى تحتــوى عــادة علـــى الجينات ستصبح غائبة إذا كان الجنــين مصـــاب بثالاســيميا ألفـــا متجانســة الزيجوت(شكل ١٤-٦).



شكل ١٤-٦ تحليل بقعة ثاوسرن لعينات د.ن.أ بشرية ، حارات ١،٣،٥،٦ عينات تحكم د.ن.أ، تحتوى على جينات جلــوبين ألفـــا سليمة. تحتوى الحارات ٢و٤ على عينات تم الحصول عليها من مرضى بثالاسيميا ألفا متجانسة الزيجوت.

استطاع كانKan وزملاؤه فى الآونة الأخيرة أن يطوروا طريقة فى غاية من البساطة لتشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا ألفا ، وتوضع بقعة من د.ن.أ الجنين على ورقة ترشيح،دون أن تخضع فى البداية للهضم أو الهجرة الكهربية،ويستخدم مجس متخصص لجين جلوبين ألفا ، ويمكن أن يميز بشكل واضح غياب جينات جلوبين ألفا فى الأجنة مع ثالاسيميا ألفا متجانسة الزيجوت(شكل ١٤-٧)، وتستخدم هذه الطريقة على نطاق واسع فى تشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا ألفا فى الصين،التى ينتشر فيها هذا المرض.



شكل ١٤-٧ تحليل بقعة نقطية لـ د.ن.أ ثالاسيميا ألفا ، كميات متناقصة من عينة د.ن.أ من رضيع مصاب بالحبن الجنينى ليست لديه جينات جلوبين ألفا تبقعت فى الزوج الأعلى من المرشحات، ويوضح مجس جلوبين بيتا وجود هذا الجين، فى حين تكون جينات ألفا غائبة، واستخدمت نسخ عينات من السائل الأمنيونى لثلاثة أشخاص مختلفين(A وB وC) فى زوج المرشحات السفلية ، وتوضح عينات B و C وجود جينات جلوبين ألفا وبيتا ،فى حين اختفت جينات جلوبين ألفا من العينة A.

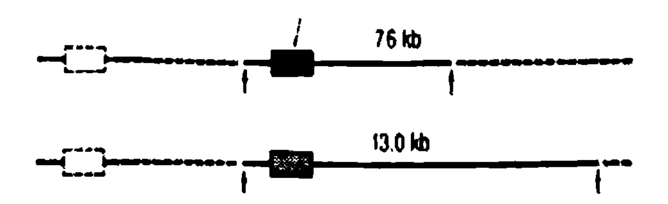
تعدد أشكال الـ د.ن.أ و تحليل الارتباط

DNA polymorphism and linkage analysis

يوضح نشوء اختبار ما قبل الولادة لمرض أنيميا الخلية المنجلية مدى سرعة التقدم الذى حدث فى تكنولوجيا تشخيص الـ د.ن.أ. وبصفة مبدئية،لا يمكن تحديد جين الخلية المنجلية إلا بطريقة غير مباشرة بواسطة تحليل الارتباط مع تعدد أشكال الـ د.ن.أ ،والتى تعتبر تغييرات فى تسلسلات الـ د.ن.أ التى تحدث بصورة طبيعية فى الأفراد، وفى الأبحاث الجديدة ، كان الجين الطافر المرتبط بتغير معين موجود بالقرب من جين جلوبين بيتا ولكن من الخارج، وفى غضون سنوات قليلة،تم استبدال هذه الطريقة بطريقة تحليل يمكن أن تحدد بدقة كبيرة وبصورة مباشرة الطفرة النكليوتيدية الواحدة فى د.ن.أ الجين نفسه، إلا أن تحليل الارتباط لا يزال يستخدم مع الـ د.ن.أ متعدد الأشكال فى دراسة وتشخيص العديد من الأمراض الوراثية.

وعندما استخدم كانKan وزملاؤه إنزيم التقييد المسمى بـHpaI لشطر عينات د.ن.أ بشرية،وجدوا أن أنماط القطع الناتجة قد تتغير من عينة لأخرى، وعلى سبيل المثال،فقد أظهر مجس لجين جلوبين بيتا أن الجين يقع عادة فى قطعة طولها ٧,٦كيلو من القواعد، ومع ذلك،أنتج هضم إنزيمHpaI للـ د.ن.أ فى بعض الأشخاص قطعة أطول تصل ١٣كيلو من القواعد وتحتوى على جين جلوبين بيتا ، ونتجت القطعة الأطول من طفرة نكليوتيدية واحدة ألغت مركز الـHpaI الأول من يمين الجين، ونتيجة لذلك،زاد طول قطعة الـ د.ن.أ بحوالى ٥كيلو من القواعد،وهى المسافة للمركز التالى الموجود عادة لإنزيم

التقييد (شكل ١٤-٨). وتوجد قطعة الـــ ١٣كيلو من القواعــد أساسًــا فـــى أشخاص من أصل أفريقى،وغالبا ما ترتبط بطفرة خلية منجلية من جين جلوبين بيتا فى جماعات من الأمريكان السود.



شكل ١٤-٨ مراكز HpaI(الأسهم)التى ترتبط بجين جلوبين بيتا الطبيعى(الخط العلوى) وجين الخلية المنجليــة(الخــط الســفلى)، والمركز على يمين الجين الطبيعى يكون غالبا من د.ن.أ مع جين الخلية المنجلية، وكنتيجة لذلك ينتج عن هضم هــذا الــــ د.ن.أ بواسطة إنزيم تقييد قطعة طول قواعدها ١٣كيلو بدلاً من قطعة طول قواعدها ٧.٦كيلو .

ولا يؤثر التغير فى مركز الـــ HpaI على وظيفة جين جلوبين بيتــا ،لكنـــه يمكن أن يستخدم كعلامة وراثية مفيدة لطفر الخليـــة المنجليـــة، وفـــى بعـــض العائلات ، يمكن أن يدل تحديد طول قطعـــة الــــHpaI علـــى مـــا إذا كـــان الكرموسوم يحتوى على طفر الخلية المنجلية أم لا ، ويعرف هذا النـــوع مـــن تعدد أشكال الــــ د.ن.أ ،الذى ينشأ عنه قطع مختلفة الأطوال عندما يهضم الـــ د.ن.أ بواسطة إنزيمات تقييد بـــ " تعدد شكل طول قطعـــة التحديـــد "(RFLP)، ولتحليل الـــRFLPs تطبيقات فى العديد من الأمراض الوراثية بالإضافة إلـــى أنيميا الخلية المنجلية.

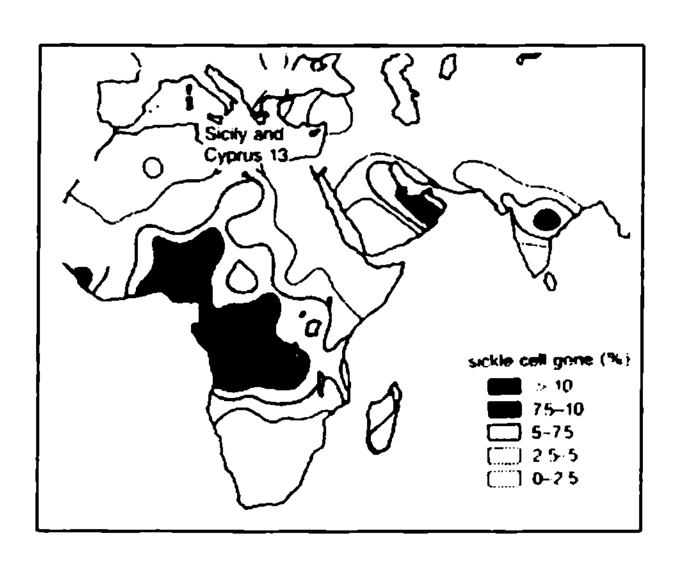
تطور جين الخلية المنجلية

Evolution of the sickle cell gene

دراسات الأسرة، التى يمكن أن يرتبط فيها وراثة مرض وراثى بـــــRFLP معين، تعتبر من المتطلبات الأساسية لتشخيص ما قبل الولادة للمرض، وعلـــى سبيل المثال،لا ترتبط جميع الجينات المنجليـــة فـــى أنيميـــا الخليـــة المنجليـــة بقطعةHpaI ذات الطول ١٣ كيلو من القواعد، ولا تحتـــوى كـــل القطـــع ذات الـــ١٣ كيلو من القواعد على الجين المنجلى، وقد أعطى تحليـــل الـــــــHpaI ومراكز التقييد الأخرى متعددة الأشكال فى مجموعة جينات جلوبين بيتا ، مفاهيم واضحة عن أصول وأنماط هجرة طفر الخلية المنجلية،ويقترح بشدة أنه حـــدث مرات عديدة فى مجتمعات بشرية، وتوضح نتائج هذا البحث سبب ارتباط بعض طفرات جين جلوبين بيتا فى الولايات المتحدة بقطعة الــــ١٣ كيلو من القواعد.

ويبدو أن طفرة مركز الـــــHpaI التى تسببت فى ظهور قطعة الـــ١٣ كيلو من القواعد المحتوية على جين جلوبين بيتا ، قد ظهرت لأول مرة فـــى فولتـــا العليا بغرب أفريقيا، وعقب ذلك ،ظهر طفر آخر – ذلك الطفر المسبب لظهور جين الخلية المنجلية– على نفس الكرموسوم الذى كان قد احتوى علـــى طفـــر الـــHpaI، ويحمى طفر الخلية المنجلية من الملاريا التى تنتشر فى هذا الجـــزء من أفريقيا،ونتيجة لذلك،زاد تكرار حدوث قطعة الـــــ١٣ كيلو قواعد مع الجين المنجلى، ولما كان لا توجد ميزة اختيارية لقطعة الـــ١٣ كيلو قواعد مع جـــين جلوبين بيتا العادى، فقد ظل تكرار حدوثه قليلاً ،ومـــن ثم،ففـــى دول غـــرب أفريقيا،مثل غانا ونيجيريا،فإن معظم قطع الـــــ١٣ كيلو قواعد لـــHpaI تحتوى

على جينات الخلية المنجلية، بينما لا يحمل إلا عدد قليل من القطع جين سلســلة بيتا الطبيعى (شكل ١٤-٩).



شكل ١٤-٩ التوزيع فى العالم القديم لقطع التقييد ذات الـــ ١٣- و الـــ ٧,٦ كيلو قواعد،التى تولدت من إنزيم الـــ H pal. و قـد رسم تكرار حدوث جين الخلية المنجلية.

وتشمل المناطق الأخرى التى توجد بها نسبة عاليــة مــن أنيميــا الخليــة المنجلية،شرق أفريقيــا والســعودية والهنــد. ففــى هــذه المناطق،احتفظــت الكرموسومات المحتوية على طفــر الخليــة المنجليــة بمركــز الــــــHpaI الطبيعى،وتعطى قطعة الــــ ٧,٦ كيلو قواعد عندما يهضمها الإنزيم . وتتضمن هذه النتيجة على أن طفر الخلية المنجلية فى هذه المناطق قد نشأ بصورة مستقلة عن الطفر الذى نشأ فى منطقة غرب أفريقيا.

وفى الواقع،فإن الدراسات الأخيرة التى حلل من خلالها رونالد ناجــال مــن كلية طب آينشتين فى مدينة نيويورك والـــ Dominique Labie of INSERM'S

Institut والـــــBiologie Cellulaires and Moleculaires فى باريس وزملاؤهم. مراكز تقييد مختلفة عديدة بالقرب من جين جلوبين بيتا ،تقترح أن الجينات فى شرق أفريقيا والسعودية والهند قد نشأت أيضا بصورة مستقلة عن بعضها البعض. ففى كل منطقة تستقر الجينات الطافرة على كرموسومات ذات أنماط تقييد مختلفة.

وترتبط حوالى ٧٠% من جينات الخلية المنجلية فى المجتمع الأمريكى الأسود بقطعة الـــHpaI ذات الـــ ١٣ كيلو قواعد . وترتبط نسبة الـــ ٣٠% الباقية بقطعة الـــ٧,٦ كيلو قواعد. وربما يعكس هذا التوزيع حقيقة أن لمعظم الأمريكان السود أصول فى تلك المناطق من غرب أفريقيا،حيث تكون قطعة الـــ ١٣ كيلو قواعد هى القطعة السائدة .

وعلى الرغم من أن تحليل الارتباط بتعدد شكل الـــHpaI لا ينجح إلا مع تشخيص ما قبل الولادة لأنيميا الخلية المنجلية بنسبة تصل إلى ٧٠% من المجتمع الأمريكى الأسود،فإن استخدام تعدد الأشكال لمراكز إنزيم تقييد أخرى يزيد من نسبة الحالات الخاضعة لتشخيص ما قبل الولادة.

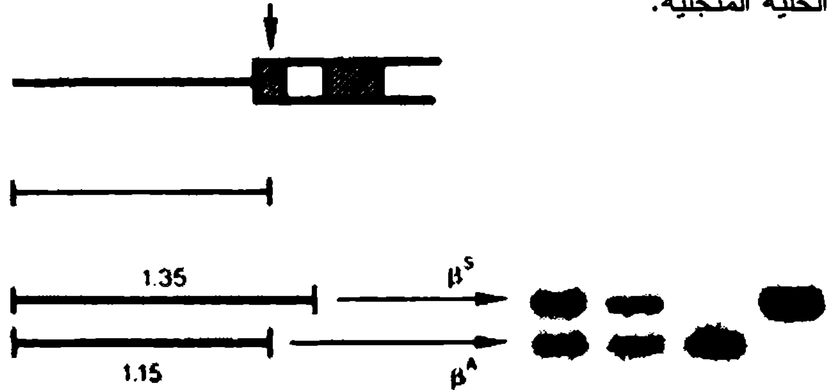
تحليل مباشر لطفرة موضعية

Direct analysis of a point mutation

يشطر إنزيم التقييدrestriction enzyme الـــ د.ن.أ أينما يجد تسلسلا مناظرا لمركز تعرفه. فتسلسل الحمض الأمينى عند المواضع من ٥ إلى ٧من جين جلوبين الطبيعى من النوع بيتا، هو برولين-حمض الجلوتاميك-حمض الجلوتاميك،الذى يشفر عنه بالتسلسل النكليوتيديCCT-GAG-GAG. ويشق إنزيم

التقييد MstIIعند تسلسل التعرفCCTNAGG،حيث تعنى Nأى نكليوتيد من النكليوتيدات الأربع فى الـ د.ن.أ،و سوف تقطع نتيجة لذلك جين الجلوبين الطبيعى من نوع بيتا عند الموقع المصاب تماما بطفر الخلية المنجلية .

وينتج عن هضم الـ د.ن.أ الطبيعى بواسطة الإنزيم قطعتان من هذه المنطقة :إحداهما التى تمتد ١,١٥كيلو قواعد ناحية اليسار من مركز التعرف، والأخرى التى تمتد٠,٢كيلو قواعد جهة اليمين من المركز(شكل ١٤-١٠). وسبب استبدال الفالين بحمض الجلوتاميك عند الموضع ٦ فى جلوبين بيتا ،هو تغير فى تسلسل د.ن.أ المناظر للجين لـCCT-GTG-GAT،والذى لا يعتبر مركز انشقاقcleavage site لإنزيمMstII. وفى أنيميا الخلية المنجلية،تندمج حينئذ قطعتى الـ د.ن.أ فى قطعة طولها١,٣٥كيلو قواعد. وباستخدام مجس د.ن.أ مشع متخصص لموقع جين جلوبين بيتا الذى يحتوى على موقع تعرف الـMstII،فمن الممكن التحليل مباشرة عن وجوده أو غيابه،ومن ثم للكشف عن جين الخلية المنجلية.



شكل ١٤-١٠ الكشف المباشر عن طفر جين الخلية المنجلية فى جين جلوبين بيتا. عندما يفقد مركز الـ MstII،الذى يشغل كودونات ٦،٥و٧ من الجين، بسبب طفر الخلية المنجلية،فإن الهضم بواسطة إنزيم ينتج قطعة ١,٣٥ كيلو قواعد بدلا من القطعة الطبيعية التى طولها ١,١٥ كيلو قواعد. تحتوى الحارات المحددة بالحروف AS على عينات د.ن.أ من شخصين حاملين لجين الخلية المنجلية. ولدى هذان الشخصان كلا النوعين من القطع. والـ د.ن.أ فى الحارة المحددة بالحرفين AA هى من شخص طبيعى،الذى ليس له إلا جين جلوبين بيتا المكتمل الطبيعى . وتحتوى الحارة المحددة بالحرفين SS على عينة د.ن.أ لمريض بالخلية المنجلية له جين طافر واحد فقط.

وقد حل تحليل الـــ د.ن.أ بشكل تام محل عينة دم الجنين فى تشخيص مــا قبل الولادة لأنيميا الخلية المنجلية. وحاليا، يعتبر أسلوب الهضم بــإنزيم الـــ MstII من الأساليب الشائعة الاستخدام للكشف عن طفر الخليــة المنجليــة،على الرغم من أنه يمكن الكشف عن الطفــر بطريقــة أخــرى مــن تحليــل د.ن.أ المباشر،التى تستخدم مجسات قليلة النكليوتيد لتحديد وجود أو غياب تسلســلات د.ن.أ معينة.

ثالاسيميا بيتا

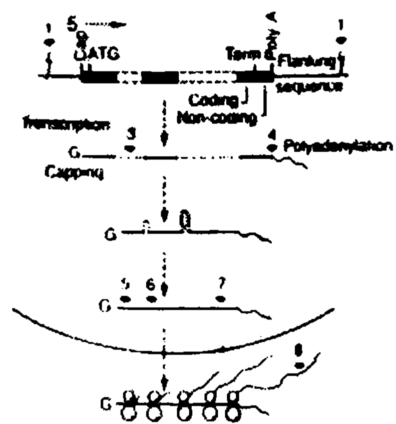
Beta- thalassaemia

يعتبر تشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا بيتا من طرق التشــخيص الأكثــر صعوبة من ثالاسيميا ألفا أو أنيميا الخلية المنجلية. فهناك أكثر مــن ٥٠طفــرا مختلفا تصيب جين جلوبين بيتا، ويتسبب عنها قصور فى بروتين جلوبين بيتــا، قد تم وصفها حتى الآن. والفواقد الصبغية هى السبب فى نســبة تصــل إلـــى ١٥%من هذا الطفر، غير أن الفواقد الصبغية نادرة، ولا تسبب عددا كبيرا مــن هذه الحالات. وتنشأ ثالاسيميا بيتا المهمة من الناحية الإكلينيكية بسبب أكثــر من٣٥ طفرا موضعيا،لا تغير سوى نكليوتيدا واحدا أو بضع نكليوتيدات.

وتقوم الطفرات الموضعية التى تم وصفها بتمزيق الوظيفة الطبيعيــة لجــين جلوبين بيتا بطرق عديدة (شكل ١٤-١١). فالبعض منها يمزق منطقة أو أخرى من مناطق التحكم قبل بداية الجينات بالضبط تعتبر ضرورية لبدء نسخ الجــين إلى ر.ن.أ الرسول،وتمنع بالتالى تخليق ر.ن.أ الرسول. بالإضافة إلــى ذلــك،

أحيانا ما تؤثر الطفرات على إشارة الإنهاء عند نهاية الجين،وينجم عنها إنهـــاء شاذ لــــــ ر.ن.أ الرسول،والذى يصبح نتيجة لذلك قليل المقدار.

وتمنع طفرات أخرى السير الطبيعى لــــ ر.ن.أ الرسول . وتتكون جينـــات الجلوبين مثل معظم جينات الكائنات الراقية الأخرى من مواقـــع مشـــفرة عـــن البروتين، إكسونات(exons) التى تنفصل عن بعضها بواسطة تسلسلات معترضة غير مشفرة تسمى انترونات(introns). ولجينات الجلوبين ثلاث إكسونات واثنان من الانترونات. وينسخ كلا من الإكسونات والانترونات فى ر.ن.أ الرسول،فى حين تنفصل الانترونات قبل أن يتحول الــ ر.ن.أ إلـــى بـــروتين. والطفـــرات الموضعية الموجودة فى ،أو بالقرب من جهة تسلسل معترض قد تجعله يُصـــنَع بطريقة شاذة. وتكون النتيجة نقص فى تخليق جلوبين بيتا،حيث تكون جزيئـــات ر.ن.أ الرسول المصنعة بطريقة شاذة فى الغالب غير مستقرة وعادة ما تكـــون غير فعالة.



شكل ١٤-١١ أنواع الطفر المختلفة التى قد تمزق تعبير جين الجلوبين، وتسبب الإصابة بثالاسيميا بيتا. ويوضح الخط العلوى تنظيم جين جلوبين بيتا مع الأكسونات المشفرة عن البروتين باللون الأسود، وتمثل الانترونات غير المشـــفرة بـــالخطوط المتقطعـــة. الفواقـــد الصبغى(١) يمكن أن تزيل جزء من الجين أو كله ،ولكنها ليست شائعة. وتصيب الطفرات المهمة من الناحية الإكلينيكيـــة واحـــدا أو بضع نكليوتيدات فقط وإذا وجدت هذه النكليوتيدات فى المحرض(٢)،وهو منطقة التحكم القريبة من بداية الجين،فإنها يمكن أن تمنع النسخ إلى ر.ن.أ الرسول. والطفرات فى الانترونات(٣) أو فى نيلpolyA (٤)يمكن أن تعترض تخليق جلوبين بيتا عن طريق منـــع السير الطبيعى لـــــ ر.ن.أ الرسول. والطفرات التى توقف تحول الرسول المصنع الى بروتين،تشمل على تغيـــرات فـــى الكـــودون(٥) والطفرات عديمة المعنى والمحركة للإطار(٦)،تولد كودونات الانهاء فى منطقة التشفير. والطفرات فى كودون الانهاء الطبيعى(٧) يمكـــن ان توقف التحول أيضا. وأخيرا،تؤدى بعض الطفرات إلى انتاج جلوبين غير ثابت(٨) الذى يتمر بطريقة مبتسرة.

وتتدخل العديد من الطفرات الموضعية أيضا فى تحويل ر.ن.أ الرسول لجلوبين بيتا إلى بروتين، حيث يمكن أن تؤثر الطفرات الموجودة فى كودون(codon) البدء على بداية التحويل . وقد تغير طفرات التسلسل المشفر كودون حمضا أمينيا طبيعيا إلى كودون توقيف(stop codon)،ونتيجة لذلك تسبب إنهاء مبتسر لتخليق السلسلة. وقد تضيف أو تلغى الطفرات الموضعية الأخرى نكليوتيدات،وتنقل إطار القراءة من موضعه،ونتيجة لذلك تغير كل الكودونات بعد الطفر. ولا تنتج أى من جينات جلوبين بيتا ذات الطفرات الانتقالية بروتينات وظيفية .

وأخيرا، تنتج بعض الطفرات هيموجلوبينات تكون غير مستقرة تماما،بسبب استبدال الحمض الأمينى فى مناطق مؤثرة من سلسلة جلوبين بيتا.

ولا يوجد سوى بضعة طفرات موضعية فى ثالاسيميا بيتا، يتصادف أن تخلق مركز تقييد جديد أو تلغى مركزا موجودا،وبذلك يمكن الكشف عنها بواسطة تحليل إنزيم التقييد.

وهناك طريقتان متاحتان للكشف عن بقية الطفرات الموضعية. الطريقة الأولى،طريقة غير مباشرة تعتمد على ارتباط الطفر بمراكز التقييد متعدد الأشكال. والطريقة الثانية،التهجين بقليلات النكليوتيد oligonucleotides،التى ترتبط بطريقة خاصة بالجين فى منطقة الطفر.

مراكز تقييد متعددة الأشكال مع مجموعة جين جلوبين بيتا

Polymorphic restriction sites along the beta-globin gene cluster

يعتبر جين جلوبين بيتا أحد أفراد عائلة جينات مرتبطة ببعضها تقع في مجموعة على الكرموسوم١١. وتشمل العائلة جينات أبسيلون، وجاما، جلوبين وجين جلوبين بيتا الكاذب غير النشط ،وجينات جلوبين دلتا،بالإضافة إلى جين جلوبين بيتا.

ومنذ اكتشاف الـHpaI متعدد الشكل ، فقد وجد أن حوالى عشرون مركز تقييد آخر فى مجموعة جين جلوبين بيتا مراكز متعددة الأشكال،أى أنها موجودة فى بعض الأشخاص ولا توجد فى أشخاص آخرين. ويمكن الكشف عن المراكز متعددة الأشكال المختلفة باستخدام مجسات للجينات العديدة الواقعة في المجموعة. وبإجراء تحليل للكشف عن وجود هذه المراكز على كرموسوم معين،فإنه يمكن إنشاء نموذج، وتصنيف الكروموسومات إلى أنماط فردانيةhaplotypes،تبعا لنماذجها .

وقد أوضحت دراسات مفصلة عن مرضى ثالاسيميا بيتا الإيطاليين وعائلاتهم،أن تسعة أنماط معينة تحدث بصورة شائعة في هذا المجتمع (شكل ١٤-١٢). ويصبح كل طفر من الطفرات المختلفة لثالاسيميا بيتا مرتبطا بنمط فردانى من الكرموسوم الذى نشأ منه. وبطبيعة الحال،يمكن أن يكون للكرموسومات التى لها نفس النمط الفردانى أكثر من طفر واحد. وبالعكس،يمكن أن يرتبط الطفر نفسه بأكثر من نمط فردانى،إما لأن الطفر يحدث أكثر من

مرة،أو لأن كرموسومين تبادلا مادتهما الجينية. ونتيجة لذلك،فإن معرفة الـنمط الفرداني لكرموسوم معين لا يشير بالتحديد إلى وجود طفر ثالاسيميا بيتا معين.

وعلى الرغم من ذلك ،ففي إحدى العائلات ،تعتبر مراكـز التقييـد متعـددة الأشكال مستعدة للعمل كعلاماتmarkers،لتدل على أي الكرموسـومات التـي تحتوي على جين جلوبين بيتا شاذ. وعند اختيار مراكز تحديد اسـتراتيجية،فإن واحـدا أو اثنـان مـن إنزيمـات التقييـد ستصـبح كافيـة عـادة لتعلـيم الكرموسومات،والتعرف على إنزيمات التحديد التي تحتوي كرموسوماتها علـى الجينات الطبيعية والطافرة، في عائلة تعرف بأنها تتعرض لخطر مرض وراثي. ويمكن استخدام هذا الأسلوب بنجاح لتشخيص ما قبل الولادة لثالاسيميا بيتا فـي العائلات التي حدث أن تم فيها إنشاء ارتباط بين نمط معـين وطفـر. ومـع ذلك،فإن هذه الدراسات العائلية مجهدة ومضيعة للوقت،وربما تكون مستحيلة إذا لم يتوفر أفراد العائلة الذين يكونون متجانسو الزيجوت بالنسبة للجين الطافر.

	ε HincII	Gγ HindIII	Aγ HindIII	ψβ1 HincII	HincII	δ	β AvaII	BamHI	(%)
I	+		-				+	+	47
II	-	+	+	-	+		+	+	17
III	-	+		+	+		+	-	8
IV		+	-	+	+		-	+	1
V	+		-	-	-		+	-	12
VI	-	+	+	-	-		-	+	6
VII	+	-	-	-	-		-	+	6
VIII	-	+	-	+	-		+	-	1
IX		+		+	+		+	+	3

شكل ١٤-١٢ مجموعة جين جلوبين بيتا. توضح الأسهم مواضع سبعة مراكز تقييد متعددة الأشكال. و تم التعرف على إنزيم التقييد لكل مركز أسفل السهم . وموضح أنماط وتكرارات تسعة من الأنماط الفردية التي وجدت في المجتمع الإيطالي. وتدل علامات + على المواقع الموجودة،وتدل علامات- على المواقع الغائبة لكل نمط فردي.

تحليل مباشر بمجسات قليلة النكليوتيد

Direct analysis with oligonucleotide probes

وهناك وسيلة أكثر دقة لتحليل الطفرات الموضعية فى ثالاسيميا بيتا تكـــون بواسطة مجسات قليلة النكليوتيد–وهى تسلسلات د.ن.أ تحتوى عادة نحـــو ١٨ إلى ٢٠ نكليوتيدا، وتوائم للارتباط مع أى تسلســـل مســـتهدف مرغـــوب فـــى مجموعة العوامل الوراثية. ولكى نفحص طفرا موضعيا، فإنه يجـــرى تخليـــق زوج من المجسات المشعة ، يناظر أحدهما التسلسل الطبيعى وينـــاظر الآخـــر التسلسل المطفر. ويجرى تهجين المجسين لاختبـــار الـــــــ د.ن.أ علـــى بقـــع ثاوسرنSouthern blots مستقلة . وفى ظل ظروف محكمة بصورة ملائمة،فإن المجس الطبيعى لن يهجن إلا مع د.ن.أ طبيعى،ولن يهجن المجس الطافر إلا مع د.ن.أ ثالاسيمى(شكل ١٤–١٣). ويمكن أن يميز هذا الأسلوب تماما الأشخاص الطبيعيون الذين لهم جينين غير مصابين عن الأشخاص الحاملين الذين لهم جينا واحدا طبيعيا وجينا آخر طافرا، والأشخاص المرضى الذين لهم جينان طافران. وقد استخدم هذا الأسلوب بطريقة ناجحة جدا مع ثالاســـيميا بيتـــا والأمـــراض الوراثية الأخرى.



شكل ١٤-١٣ تحليل مجس قليل النكليوتيد لطفر ثالاسيميا بيتا. تحول الطفرة الكودون التاسع والثلاثين من جين جلوبين بيتا من CAG إلى TAG،و بالتالي يغير كودون جلوتامين إلى كودون توقيف. وينتشر هذا الطفر في إيطاليا. ويكشف مجس قليل النكليوتيد β A عن تسلسل جين جلوبين بيتا الطبيعي، ويكشف β th عن التسلسل الطافر. وفي العقلة المختبرة فإن الأباء (١-١و٢-١) يعتبران متغايرا الزيجوت بالنسبة للطفر. ويهجن د.ن.أ الخاص بهما مع كلا المجسين. ويهجن د.ن.أ من طفلهما(II-١) الذى يعتبر متجانس الزيجوت بالنسبة للطفر مع المجس الطافر فقط.

وتبدو مهمة اختيار المجس المناسب لعائلة معينة مهددة بالمرض من المهام الصعبة،لأن العديد جدا من الطفرات الموضعية تسبب ثالاسيميا بيتا،وتحتاج كل طفرة إلى زوجها الفريد من المجسات قليلة النكليوتيد . ومع ذلك، تدل دراسات حديثة لثالاسيميا بيتا فى إيطاليا على أنه على الرغم من وجود العديد من الطفرات المختلفة فى مجتمع ،فالبعض منها فقط هو الذى يحدث بصورة متكررة. وتسبب ثلاث طفرات من الطفرات التسع التى درست فى إيطاليا أكثر من ٨٠% من آفات ثالاسيميا بيتا.

وعلاوة على ذلك،فإن للطفرات توزيعات جغرافية متميزة. فاثنان من الطفرات يسودان منطقة فيرارا على سبيل المثال،فى حين تسبب إحدى الطفرات

٩٥% من الآفات فى جزيرة سردينيا. ونتيجة لذلك، فإذا كانت المنطقة الإيطالية التى نشأ بها مريض العائلة معروفة،فإنه يمكن اختيار مجسات ملاءمة لاختبـــار طفر ثالاسيميا بيتا.

اضطرابـــات وراثيـــة أخرى

Other genetic disorders

يوجد حوالى ٣٠٠٠ مرض وراثى تنشأ بسبب طفرات تؤثر علـــى جينـــات فردية،حيث تصيب الجينات المعيبة التى تحمل على كرموسومX، الذكور بصفة أساسية،الذين لديهم كرموسومX واحدا فقط. فالذكور لديهم فرصة ٥٠% لوراثة جين طافر من أنثى حاملة له، ويطورون المرض المشـــكوك فيـــه. وللإنـــاث كروموسومان من نوعX،ويجب أن تكـــون لـــديهن جينـــا معيبـــا فـــى كـــلا الكروموسومان حتى تظهر أعراض المرض. ومرض الهيموفيليا، وهو المرض الذى لا يتجلط فيه الدم بصورة طبيعية هو مثالا لارتباط المرض بكرموســـومX هذا.

والاضطرابات الوراثية التى تنشأ بسبب الجينات المحمولة على الصـــبغيات الجسديةautosomes،أى على الكرموســـومات الأخـــرى غيـــر كرموســـومات الجنس،إما أن تكون اضطرابات متنحية أو سائدة. فالأمراض الصبغية الجسدية السائدة تكون واضحة،عندما يكون جين واحد فقط من الجينان مصابا ؛فمرض هنتينجتون (والذى يسمى أيضا بكوريا هنتينجتون) مثال واضحا لهـــذه الحالـــة. فالاضطرابات الصبغية الجسدية المتنحية،التى تضم معظم الأمراض الوراثية،لا تعتبر أعراض مرض عادة إلا عندما تصاب كلا نسختى الجين. وفـــى خـــلال

الخمس سنوات الماضية كشف تحليل الـ د.ن.أ عن الجينات المصابة بأعداد متزايدة فى هذه الأمراض.

وفى الأمراض التى تم فيها تحديد منتج الجينات المصابة،فإن طريقة التحليل بالـ د.ن.أ تكون مشابهة للطريقة المستخدمة فى تحليل جينات الجلوبين. ويجرى عزل جين الـ د.ن.أ،وإذا كان الطفر المسبب لإصابة الجين لم يتم تصويره بدقة بعد،فيستخدم كمجس تهجين للكشف عن الجين الشاذ من خلال الارتباط بمواقع التقييد متعددة الأشكال. وإذا كانت الآفات الجينية معروفة،فيمكن القيام بالكشف المباشر بإنزيمات التقييد أو المجسات قليلة النكليوتيد. وإذا كان منتج الجينات المصابة غير معروفا،كما فى حالة مرض هنتيجتون وتليّف البنكرياس الحوصلى cystic fibrosis،فتقتضى الاستراتيجية استخدام قطع من الـ د.ن.أ البشرى كمجسات للبحث عن ارتباطات للجين الطافر.

الأمراض التى تكون فيها نواتج الجين الشاذ معروفة

Diseases in which abnormal gene products are known

مرض الخلل الأيضى الوراثيPhenylketonuria،مرض صبغى جسدى متنحى، ينشأ فى معظم الأحوال نتيجة عيب فى إنزيم فنيل ألانين هيدروكسيلازphenylalanine hydroxylase،الذى يحول الحمض الأمينى فنيل ألانينphenylalanine إلى حمض تيروسينtyrosine. وكنتيجة لضعف نشاط الإنزيم،تتراكم تركيزات عالية من الفنيل ألانين فى الدم والأنسجة الأخرى. وتسبب تركيزات الفينا ألانين تأثيرات ضارة على نمو المخ. ولا تظهر تأثيرات

المرض عند الولادة،ولكن بمجرد أن يبدأ الوليد فى تناول غذاء غنـــى بالفينـــل ألانين–مثل اللبن–تظهر أعراض المرض بصورة واضحة. وعندما تترك هــذه الأعراض بدون علاج،فسيكون لدى ٩٨% من المرضى حاصلات ذكـــاءIQs أقل من ٧٠(ويعتبر حاصل الذكاء ١٠٠،هو الحاصل المتوسط بالنسبة لمجتمع). وتشمل الظواهر الأخرى لخلل الأيض الوراثى علـــى التشـــنجاتconvulsions وسلوك ذهانيpsychotic behaviour وإكزيما eczema ونقص فى تصبغ البشرة.

ويمكن الكشف عن الحالة بسهولة عند الولادة بسبب التركيزات العالية للفينل ألانين التى تظهر فى البول. ويتكون العلاج الحالى من إبقاء الطفــل المصـــاب على وجبة غذائية تحتوى على القليل من هذا الحمض الأمينى. وتعتبر المراقبة الواعية لفينيل ألانين الدم أمرا ضروريا، حيث تكون لتركيزات الفينيل ألانـــين المنخفضة نفس خطورة التركيزات العاليـــة، و يمكـــن أن تـــؤدى المســـتويات المنخفضة غير العادية من الحمض الأمينى إلى نمو ضـــعيف، وتـــأخر نمـــو العظام، وتضخم فى الكبد، وعدوى، ومستوى منخفض من الســـكر فـــى الـــدم، واضطرابات عصبية.

والمرضون الذين يلتزمون بنظام غذائى صارم،سينمون بصـــورة طبيعيـــة، بالرغم من أن حاصل ذكاؤهم سيكون عند حده الأدنـــى مـــن حاصـــل الـــذكاء المتوسط. ويعد إبقاء الطفل على وجبة غذائية ذات محتوى فنيل ألانين منخفض من الأمور الصعبة ،لأنه يجب فى هذه الحالة تجنب العديد من الأطعمة الشعبية. وحتى عندما يعالج، فيمكن أن يفرض المرض نتيجة لذلك مشاكل نفسية وسلوكية (عدم لباقة وحسن تصرف).

واستطاع مؤخرا سافيو ووو Savio Woo وزملاؤه فى كلية طب بـــايلور فـــى هيوستون بولاية تكساس أن يستنسخوا جينا للفنيل هيدروكسيلاز phenylalanine hydroxylase. ويبلغ طول الـــ د.ن.أ المستنسخ الذى يعتبر نســـخة مـــن ر.ن.أ الرسول المناظر ٣كيلو قواعد تقريبا. ويشغل تسلسل مجموعة العوامل الوراثية كله حوالى ١٠٠كيلو قواعد من الــــ د.ن.أ. ولما كان الجين كبيـــرا جدا،فإنـــه يحتوى على العديد من مراكز التقييد متعددة الأشكال. وتعمـــل هـــذه المراكـــز كعلامات لتحليل الارتباط للتعرف على حامل المرض، وكشف لما قبل الـــولادة عن قصور الفنيل ألانين هيدروكسيلاز phenylalanine hydroxylase. وقد بـــدء فى فهم الطفرات التى تسبب خلل الأيض الوراثى، إذ وتوضح النتـــائج حتـــى الآن،أن طفرات قليلة فقط هى التى تسبب هذا الاضطراب،على الأقل فى شمال أوروبا. وبمجرد أن يتم تحديد هذه الطفرات،فسيصبح مـــن الممكـــن الكشـــف المباشر بواسطة قليلات نكليوتيد أو إنزيمات تقييد معينة .

وهناك مرض وراثى آخر معروف عيبه البروتينى ،هـــو نقـــص ألفـــا-١-أنتيرسبين alpha-١-antitrypsin. ويعتبر هذا المرض الكابح الرئيسى للجسم،أو إنزيمات البروتياز التى تهدم البروتينات. والمرض متغير تماما فى حدتـــه،غير أن الأشخاص المصابين به يعانون من تلف بالكبد،لأن كابح البروتياز لا يمكنه أن يفرز من الكبد، ويعانون مـــن أمفزيمـــاemphysema،لأن الـــــــ-alpha-١ antitrypsin،هو الكابح الرئيسى لإنزيم الالستاز elastase،الذى يشطر البـــروتين فى الجهاز التنفسيrespiratory tract. وكنتيجة للنشاط الزائد لإنـــزيم اللاســـتاز تعانى الرئتان من تلف واضح بسبب الأمفزيما.

ويعتبر بروتين alpha-١-antitrypsin متعدد الأشكال بصورة غير عادية-فقد تم تمييز ما يزيد عن ثلاثين نوعا متغيرا منه حتى الآن. وأهم هذه الأنواع هو نوع Z،الذى ينشأ نتيجة تطفر حمض الجلوتاميك إلى حمض ليسين lysine عند موضع الحمض الأمينى ١٥٣. ويمكن حاليا التمييز بين جين Z والجين الطبيعي M، عن طريق التهجين مع مجسات تخليقية قليلة النكليوتيد،وقد استنبطت مجموعة وطريقة ناجحة لتشخيص ما قبل الولادة لنقص الـ alpha-١-antitrypsin.

ومن أشهر اضطرابات النزيف الوراثى،اضطرابات الهيموفيليا haemophilias disorders، حيث يتسبب عن الهيموفيليا A،التى تحدث نتيجة نقص معامل التجلط VIII ٩٠% من الحالات، وتسبب الهيموفيليا B،والتى تحدث نتيجة نقص فى معامل التجلط IX،الحالات العشرة الباقية. وتختلف درجة النزيف التى يعانى منها المرضى تبعا لكمية معامل التجلط الموجود فى الدم. ويحتاج بعض المرضى إلى عمليات إدخال معامل VIII أو معامل IX للاحتفاظ بتركيزات كافية منه لمنع النزيف. ولا يعانى البعض الآخر من نقص حاد و يحتاجون عمليات إدخال بكميات أقل من هذين المعاملين.

ويعتبر نوعا الهيموفيليا من الاضطرابات المرتبطة بالجنس،حيث تقع جيناتهما على الذراع الطويل من كروموسوم X. وتكون لدى الأنثى الحاملة للمرض،فرصة ٥٠% لأن تنجب ابنا مصابا بالمرض،وفرصة ٥٠% أيضا لإنجاب ابنة حاملة للمرض. والطفرات التلقائية-وهى تلك الطفرات التى تظهر فى عائلة ليسا لها تاريخ إصابة بالمرض-قد تم بحثها أيضا. ويبدو أن الملكة

فيكتوريا[٢] على سبيل المثال،كانت تحمل هذا الطفر التلقائى. فقد أصيب الأمير ليوبولد أصغر أبنائها الأربعة بالهيموفيليا،وكانت اثنتان من بناتها أليس وباتريشيا حاملتين للمرض. وتزوجت ابنتها أليس قيصر روسيا نيقولا الثانى وأصبحت الإمبراطورة ألكسندرا. وظهرت على ابنهما ألكسيس أعراض الهيموفيليا،وهى الحالة التى ساعدت على انهيار الأسرة الملكية الروسية فى ثورة عام ١٩١٧ .

وقامت مجموعتان من الباحثين،إحداهما من شركة جينتك فى جنوب سان فرانسيسكو وأخرى من معهد جينتك فى بوسطن بولاية ماساشوتس باستنساخ جين لمعاملVIII. وقام جورج برونلى من جامعة إكسفورد بإنجلترا وإيرل ديفيز من جامعة واشنطن فى سيتل وزملاؤهما باستنساخ جين معاملIX. وتؤثر العديد من الطفرات التى تشمل كلا من الطفرات الموضعية، والإلغاء الكامل أو الجزئى على وظائف الجينان. بالإضافة إلى ذلك،فقد تم التعرف على العيوب التى تمنع الوصل الطبيعى لـ ر.ن.أ الرسول بمعاملIX.

تؤثر العديد من طفرات جين المعاملVIII على مراكز تعرف التقييد،ويمكن الكشف عنها بالتحليل الإنزيمى المباشر. ويوجد أيضا عددا من المراكز متعددة الأشكال داخل وحول جينات معامل التجلط التى يمكن استخدامها فى اقتفاء أثر الهيموفيليا، فى حالات لا يمكن فيها الكشف المباشر عن الطفر. فالمجس المصنوع من قطعة د.ن.أ عشوائية،يكشف عن مركز على درجة كبيرة من

[٢] الملكة فيكتوريا(١٨١٩-١٩٠١):ملكة بريطانيا العظمى(١٨٣٧-١٩٠١)وامبراطورة الهند(١٨٧٦-١٩٠١).اتسعت فى عهدها رقعة الامبراطورية البريطانية. المترجم

التعدد الشكلى،ويرتبط ارتباطا وثيقا بجين معاملVIII،ويمكن استخدامه لتحليل ارتباط هيموفيلياA.

ويمكن استخدام مجسات الـ د.ن.أ أيضا للكشف عن حامل المرض. فعلى الرغم من إمكانية تشخيص مريض الهيموفيليا بسهولة عن طريق قياس مستوى نشاط معاملVIII أوIX فى بلازما دمه،إلا أن تحديد الإناث الحاملة لجين الهيموفيليا يعد من الأمور الصعبة . فمتوسط تركيزات معدل تجلطهن ٥٠% من الطبيعى،لكنها تظهر تغيرية كافية تخيم على التحديد الإيجابى لبعض المرضى. ويمكن أن تحدد علامات الـ د.ن.أ أى الكرموسومات التى تحمل الجين الشاذ، وبذلك يمكن تحديد الإناث الحاملة للمرض.

أمراض ذات مواقع جينية غير محددة

Diseases with undefined genetic loci

العيوب البروتينية التى تتضمنها الاضطرابات الوراثية العديدة غير معروفة،على الرغم من أن الحالات تسبب أعراضا معروفة إكلينيكيا. فحتى الكروموسومات التى تقع عليها الجينات المعيبة،تكون فى غالب الأحوال غير محددة،إلا إذا كان يضع نمط وراثة المرض الجين على الكرموسوم X. وقد يمكن أيضا تمييز الموقع الكرموسومى،إذا حدثت الأعراض الإكلينيكية فى مرضى حذفت منهم بعض قطع كرموسومية معينة،ففى تلك الحالة يمكن استنتاج أن الجين المعيب يقع على القطعة الملغاة.

ويقدم تحليل الـ د.ن.أ طريقة تعرف على الجينات المعيبة فى تلك الأمراض الوراثية،التى لا يوجد عنها أية معلومات عن العيب الكيميائى الحيوى.

فبعض تسلسلات الـــــ د.ن.أ تظهر مرة واحدة فقط فـــى مجموعـــة العوامـــل الوراثية البشرية،فى حين تتكرر التسلسلات الأخرى مئـــات أو آلاف المـــرات. ولدراسة الأمراض المشتملة على منتجـــات بروتينيـــة غيـــر معروفة،تســتخدم تسلسلات وحيدة فردية أولا فى التعرف على مراكز التقييد التى تظهـــر تعـــدد الأشكال. وهذا التسلسل يمكن أن يستخدم بعد ذلك فى فحص الـــ د.ن.أ أفراد من مجتمع مصابون بالمرض الوراثى،للتعرف على ما إذا كان هناك متغير معـــين للمركز متعدد الأشكال موروثا مع المرض. فإذا وجد هذا الارتبـــاط، يفتـــرض حينئذ أن جين المرض والمركز متعدد الأشكال بالقرب من بعضهما البعض على نفس الكرموسوم. ويمكن الكشف عن هوية هذا الكرموسوم بعد ذلك بأى طريقة من الطرق العديدة.

والأشخاص المصابون بمرض هنتينجتون يكونـــون أصـــحاء حتـــى ســـن الأربعين. وفى هذه السن تسبب التغيرات الهدامة فى الجهاز العصبى المركزى حركات غير متناسقة ولا إرادية. ومع تقدم المرض يصبح المرضى مـــوهنين جسمانيا وعقليا،وعادة ما يتوفون فى غضون سنوات قليلة مـــن بـــدء ظهـــور الأعراض.

يكون لدى أطفال مريض مصاب بمرض هنتينجتون فرصة ٥٠% لأن يرثوا الجين. ولما كان الجين من النوع الصبغى الجسدى السائد،فكل من يرث المرض سيطوره . وكان لا يمكن من قبل تحديد الذين يرثون مرض هنتينجتون إلى أن تتطور الأعراض، غير أن جيمس جوسيللا James Gusellaمن مدرسة الطـــب بهارفارد وزملاؤه استطاعوا أخيرا تمييز علامة لمرض هنتينجتون. وقد قـــاموا بهذا بواسطة العديد من مجسات د.ن.أ العشوائية لدراسة قبيلة فنزويلية مصـــابة

بهذا المرض. ونجح أحد المجسات فى تحديد مركزا متعدد الأشكال مرتبط تماما بالمرض وحدد بعد ذلك مركزه عند طرف كرموسوم٤. ولا تزال تبذل الجهود لتحديد الجين نفسه.

ويعتبر الحثل العضـــلى دشـــينDuchenne muscular dystrophy،الصـــورة الشهيرة من صور الحثل العضلى. ويعانون الذكور المصابون بـــالمرض مـــن الضعف الناتج عن الانحلال العضلى التدريجى،الذى يبدأ فى الرحم ويستمر لما بعد الولادة. وتلاحظ دلائل المـــرض فـــى البدايـــة بضـــعف فـــى عضـــلات الأطراف،لكنها تتقدم لتشمل كل العضلات بما فيها عضلة القلـــب. وغالبـــا مـــا يتوفى الأفراد المصابون بالمرض أثناء مرحلة الطفولة.

وتحدث لـــبعض مرضـــى الحثـــل العضـــلى دشـــين Duchenne muscular dystrophy تغييرات فى أوضاع الذراع القصير لكرموسومX،ويحتمل أن يقـــع الجين العيب فى هذه المنطقة. وتركز اهتمام العديد من المجموعات البحثية على هذه المنطقة الكروموسومية،وأوجدت مجسا لمركز قريـــب جـــدا مـــن جـــين الـــــDuchenne muscular dystrophy. وقد ساعد المجس الباحثون فى اقتفـــاء أثر وراثة المرض بنسبة يقين بلغت٩٥%من الحالات.

ويعتبر تليف البنكرياس الحوصليCystic fibrosis من الاضطرابات الصبغية الجسدية المتنحية الشهيرة،التى تحدث بنسبة ١فى ٢٠٠٠ من الولادات الحية فى المجتمع القوقازى. ولا تظهر على حاملى الجين المعيب أية أعراض،فى حـــين يصاب الأشخاص الذين يرثون نسختين من الجين بإعياء شديد، وتفـــرز غـــدد الإفرازsecretory glands مخاطا سميكا. وعندما يتراكم هذا المخاط فى الشـــعب الهوائيةbronchial tubes للرئتين،ينشأ عنه مرض رئوى عائق مزمن وعـــدوى

متكررة. ويكون إفراز البنكرياس أيضا إفرازا شاذا،وتكون النتيجة عدم هضم الطعام بصورة سليمة ويمتص من الأمعاء. ويعانى الأشخاص المصابون بالمرض من تليّف فى الكبد،وغالبا ما يكون الذكور عديمى الخصوبة. وتفرز غدد العرقsweat glands تركيزات عالية بصورة شاذة من كلوريد الصوديوم،الذى يمكن أن يستخدم كاختبار تشخيصى للمرض. وفترة الإصابة بتليف البنكرياس الحوصلى والتكهن بما سيتطور إليه المرض متغيرة،وتتوقف على مدى شدة الإصابة التى تأثرت بها الرئتين.

واستخدم لاب تشى تسو Lap Chi من جامعة ترنتو بكندا ،وروبرت ويليامزRobert William من مستشفى سانت مارى بلندن،مجسات عشوائية من د.ن.أ للبحث عن المحل الجينى لتليف البنكرياس الحوصلى. واكتشفوا مجسات د.ن.أ تتعرف على مراكز قريبة من الجين، الذين تم تحديد موقعه على الذراع الطويل لكرموسوم٧. ويرتبط اثنان من المواقع ارتباطا وثيقا بالجين، لدرجة أن هذا المرض يمكن تتبع أثره بمستوى ثقة أكبر من ٩٥%. ويجرى استخدام المجسات بصورة ناجحة للكشف عن حاملى المرض وتشخيص ما قبل الولادة.

موضوعات أخلاقية أثارها تشخيص ما قبل الولادة

Ethical issues raised by prenatal diagnosis

يعتبر عدد الأمراض الوراثية الخاضعة للكشف بتكنولوجيا الـ د.ن.أ الجديدة فى تزايد مستمر، فقد أصبح من الممكن إجراء تشخيص ما قبل الولادة للأمراض التى لم يكن من غير المستطاع من قبل الكشف عنها قبل الولادة،وأتاحت التعرف على حاملى الجينات المصابة. وبلا شك ،فقد أفادت هذه

التطورات الحديثة الأعداد المتزايدة من الأسر التى كانـــت تتـــأثر بـــالأمراض الوراثية.

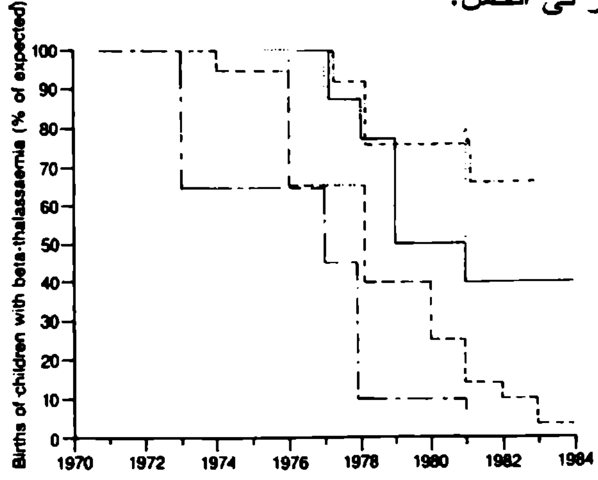
وعلى الرغم من ذلك،فغالبا ما يثير التقدم العلمى أسئلة،وقد نشأت العديد من الموضوعات الأخلاقية المهمة كنتيجة لتوفر اختبارات ما قبل الولادة. ولما كانت طرق العلاج غير متوفرة لمعظم الاضطرابات الوراثية،فإن تحديد جنين مصاب يعطى الأبوين أساسا خيار لإنهاء الحمل. وسواء أكان هذا الأمر يجد لـــه مـــا يبرره لكل مرض وراثى،فإنه يعتبر من الموضوعات التى يخاض فيها الجـــدل العنيف. وأحيانا ما تكون الخيارات واضحة تماما،فمن المحتم أن يتوفى الجنين المصاب بثالاسيميا ألفا إما قبل أو عند الولادة. وقد وفّر الإجهاض المبكر للحمل على الأم عشرون أسبوعا من الحمل،بالإضافة إلى التعقيدات الناجمة من تســـمم الدم،وفترة المخاض الصعبة ونزيف ما بعد الولادة.

ومكّن العلاج الحالى لمرضى ثالاسيميا بيتا متجانس الزيجوت بالحقن اليومى بالديسفروكسامين وعمليات نقل الدم كل شهر من أن يعيشوا حياة طبيعية أو شبه طبيعية. وعلى الرغم من ذلك،فإنه لا يمكن تقييم أبعاد العـــلاج علـــى المـــدى الطويل حتى الآن،حيث بدء فى تعاطى هذا العلاج منذ السبعينيات. وعلاوة على ذلك،يفرض نظام العلاج أعباء على المريض وأسرته. حيث تشكل تكلفة العلاج المرتفعة التى تصل إلى ٥٠٠٠٠دولار فى العام عبء كبير على أسرة المريض وعلى اقتصاد الدول النامية التى ينتشر فيها المرض.

وقد أثر توفر تشخيص ما قبل الولادة والإجهاض الاختيارى على الأنمـــاط الإنجابية للأشخاص حاملى جين ثالاسيميا بيتا، فالعديد من هـــؤلاء الأشـــخاص

الذين شاهدوا بالفعل معاناة طفل مصاب،ولم يكن لهم أطفال من قبل، يفضـــلون الآن تجنب هذه المعاناة لأبنائهم. ففى إيطاليا و اليونان وقبرص،تناقصت أعــداد الو لادات المصابة بالتجانس الزيجوتى إلى حد كبيـــر أو ربمـــا تكـــون انتهــت تماما(شكل ١٤-١٤).

وكان لتشخيص ما قبل الـــولادة لأنيميـــا الخليـــة المنجليـــة درجـــة قبـــول مختلطة،ويرجع ذلك أساسا لتقلب دور المرض الإكلينيكى، حيث يمكن لمعظـــم مرضى أنيميا الخلية المنجلية توقع حدوث بعض الأعراض،فـــى حـــين تكـــون أعراض مرض بعض الأفراد أشد من البعض الآخر. والســـبب الـــذى يجعـــل المرضى يكون لهم هذه التكهنات المتقلبة عن المرض غير معروف تماما،ومن المستحيل توقع ما إذا كان الشخص المصاب ستظهر عليه أعـــراض المـــرض الإكلينيكية الشديدة. وتوضح الخبرة الأولية مع تشخيص مـــا قبـــل الـــولادة،أن حوالى نصف الآباء يختارون إجهاض الجنين المصاب،بينما يفضـــل النصـــف الآخر الاستمرار فى الحمل.



شكل ١٤-١٤ تناقص أعداد الأطفال المولودين بثالاسيميا بيتا متجانسة الزيجوت فى بعض الدول منذ إدخـــال تشخيص ما قبل الولادة.

وأثار توفر تشخيص ما قبل الولادة لخلل الأيض الوراثى موضــوعا آخــر، ويمكن تشخيص هذا الاضطراب عند الولادة بواسطة اختبار بسيط للـــدم. فـــإذا اتبع الطفل المصاب وجبة صارمة أثناء فترة الرضاعة والطفولة،فيمكنه تجنــب العديد من مضاعفات المرض. ومع ذلك،يحدث لبعض الأطفال الذين يصـــابون بالمرض تلف متخلف بالمخ،ويعانى بعض المرضى من مشاكل نفسية وسلوكية شديدة،بسبب النظام الغذائى الصارم الذى يفرض عليهم اتباعه. ونتيجة لـــذلك،لا يزال يفضل بعض الآباء إجراء تشخيص ما قبل الولادة والإجهاض الاختيارى.

وتبرز القدرة على تحديد هؤلاء الذين ورثوا جينا فى حالات مثـــل مـــرض هنتينجتون مجموعة مشاكل مختلفة. فقد تمكنت مجسات الـــــ د.ن.أ من تحديد هذا المرض، منذ سنوات عديدة قبل أن يستفحل . ولما كانت لا توجـــد طـــرق علاجية لتغيير خط سير المرض،فإن تحديد هؤلاء الأشخاص المصابين فى فترة مبكرة من العمر،قد يشكل عليهم أعباء نفسية ضخمة. إلا أنه يساعدهم أيضـــا على اتخاذ قرار مدروس،فيما إذا كانوا يرغبون فى إنجـــاب طفل،ويخـــاطرون بنقل الجين إلى ذرية أخرى. وعلاوة على ذلك،فيمكن أن يقدم تخفيـــف هائـــل لحوالى ٥٠% من ضحايا مرض هنتينجتون المحتملين،الذين يبدو أنهم لم يرثوا الجين.

اتجـــاهات مستقبـــلية لأبحاث الـــــ د.ن.أ فى الأمراض الوراثى

Future directions of DNA research in genetic diseases

سيمكن استخدام مجسات الـــ د.ن.أ فى النهاية الباحثين من تحديـــد العيـــوب الجزيئية الدقيقة فى أمراض مثـــل Duchenne's muscular dystrophy وتليـــف

البنكرياس الحوصلى ومرض هنتينجتون. وتمكن طرق "المشى" أو"القفز" علــى كروموسوم من التحرك بســرعة أكبــر نســبيا مــن موضــع لآخــر علــى الكرموسوم،وسوف تتيح لهم فى النهاية التحرك من العلامات التى حددوها لهذه الأمراض الوراثية إلى الجينات المصابة.

وقد يتأثر تطور بعض الأمراض نسبيا ببعض الاســتعدادات الوراثيــة،على الرغم من أن الحالات لا تكون فى الأصل وراثية تماما. ويختص مجال آخر من الأبحاث باستخدام مجسات الــــ د.ن.أ فى تحديد الأشخاص المعرضين لهــذه الأمراض،التى قد تشمل أمراض القلب وعلى الأقل بعض السرطانات. وهنــاك بعض الدلائل ،على سبيل المثال، أن بعض الــــــ د.ن.أ المتعــددة الأشــكال مرتبطة بجين لبروتين حامل للكلوسترول،قد تظهر استعداد للإصابة بالنوبــات القلبية. وهناك جهود لا تزال محل البحث لتحديد الأشخاص المعرضين للإصابة بالسرطان.

وربما تكون الآمال الأكثر إثارة التى تقدمها تكنولوجيــا الــــــ د.ن.أ،هــى التمكن فى آخر الأمر من علاج الاضطرابات الوراثية،عن طريق إدخال جينات طبيعية مستنسخة فى مجموعة العوامل الوراثية البشرية(أنظر الفصل الخــامس عشر). ففى إحدى الاستراتيجيات،تستخدم المتجهات الفيروســية لحمــل جــين طبيعى،بالرغم من عدم إمكانية التحكم فى نقطة الإدخال فى مجموعة العوامــل الوراثية بواسطة هذه المتجهات. وعلى الرغم من ذلك،يتقــدم البــاحثون نحــو محاولة تجريب هذه الطريقة لتصحيح قصور إنزيم يسبب مرض نقص مناعــة شديد. وتعتبر أيضا أعــراض مــرضLesch-Nyhan ومــرضGaucher مــن الأمراض المرشحة للعلاج الجينى بهذا الإجراء.

وهناك استراتيجية أخرى لا تزال فى مراحل تطورها المبكرة جدا،وتهـدف إلى استبدال الجين الشاذ بنسخة مستنسخة طبيعية. وقد تنجح هذه الطريقة تماما مع مرض أنيميا الخلية المنجلية والثالاسيميات،التى يجب أن يتم فيهـا ضـبط الجينات بدقة أثناء النمو الطبيعى. وتظهـر نتـائج الخلايـا المنزرعـة فـى المزرعة،أن جينا يمكن أن يدخل فى موقعه الطبيعى،على الرغم من أن الإدخال يجب أن يتكرر بصورة أكبر كثيرا من التكرار الذى يتم حاليا،قبل أن تصبح هذه الطريقة فعالة. وعلى الرغم من ذلك،فقد كان مستقبل العلاج بالجين منذ سنوات قليلة ماضية مجرد حلم. وبفضل تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم فقد يصبح هـذا الحلم حقيقة.

الفصل الخامس عشر

مستقبل العلاج بالجين للأمراض الوراثية البشرية

The prospect of gene therapy for human hereditary diseases

ربما سيحدث الأثر البالغ العمق للقدرة الجديدة على استغلال الـ د.ن.أ في حقل علاج الأمراض الوراثية البشرية التي تسببها جينات معيبة، والعديد من هذه الحالات نادر نسبياً، وعلى سبيل المثال، يصيب مرض تليّف البنكرياس الحوصلي، الذي يعتبر من أكثر الأمراض الوراثية انتشاراً بين القوقازيين يصيب حوالي ١ من كل ١٨٠٠ شخص أبيض في الولايات المتحدة، ومرض أنيميا الخلية المنجلية، الذي يصيب السود أساساً ،يحدث بنسبة فرد واحد من كل ٥٠٠رضيع أسود يولد في الولايات المتحدة، وقد تصيب بعض الأمراض الوراثية الأخرى عدد قليل من الأفراد، وعلى الرغم من ذلك،فالتأثير الكلي للعيوب الوراثية يعد كبيراً، ووفقاً للتقديرات الحالية فإنه هناك ما لا يقل عن ٣٠٠٠ مرض وراثي.وعلاوة على ذلك، فإن تأثير هذه العيوب في غالب الأحوال يكون تأثيراً قاتلاً،أو على الأقل موهناً ، فأي جين شاذ إما أنه لا ينتج بروتينا على الإطلاق،أو يخلق بروتيناً لا يعمل بالصورة الصحيحة، ويمكن علاج القليل من الأمراض الوراثية تماما بإعطاء المريض البروتين الذي فشل الجين في إنتاجه بصوره طبيعية، ونوع القزامةdwarfism،التي تحدث بسبب إنتاج غير كاف أو عدم إفراز هرمون النمو من الغدة النخاميةpituitary gland، هو مثال ينطبق على ذلك، فالحقن بهرمون النمو البشرى،الذى أصبح حالياً

متوفر بواسطة استنساخ الجين الذى يمكنه المحافظة على النمـــو الطبيعـــى إذا عولج به المريض فى وقت مبكر.

ومع ذلك ، فلا تخضع معظم الأمراض الوراثية تماماً للعلاج ، وقد يصـــدق هذا حتى عندما يتم دراسة الجين المعيب دراسة مستفيضة،كما فى حالة أنيميـــا الخلية المنجلية، ويمكن للرعاية الطبية الجيدة أن تساعد مرضى الخلية المنجلية على أن يعيشوا عشرات السنين،لكنهم سيتعرضون للوهن ولآلام الخلية المنجلية المبرحة، والأشخاص المصابون بتليف البنكرياس الحوصلى،نادراً ما يعيشـــون بعد سن العشرين أو الثلاثين ، والأمراض الوراثية الأخرى،مثل مرض تـــاى-ساكس وبعض الأمراض الوراثية الحادة الناجمـــة عـــن نقـــص المناعـــة،تفتك بالمرضى فى عمر مبكر،بعد سنة أو بضع سنوات قليلة من ولادتهم .

وكان للقدرة على عزل جينات معينة واستنساخها ،أن فتح الطريق أمام مجال مثير جديد لعلاج الأمراض الوراثية،لم يقتصر فقط على تعويض المريض عن البروتين المفقود،ولكن بإعطائه جيناً جديداً سليما تماماً يحل محل الجين الـــذى فشل فى أداء وظيفته، ومنذ بداية الثمانينات،خطى الباحثون خطوات كبيرة نحو تطوير طرق لإدخال جينات جديدة فى خلايا الحيوانات، وأثبتت الجينات فاعليتها تماماً،وأنتجت منتجاتها البروتينية النشطة فى الخلايا التى تم اســـتزراعها فـــى أطباق المعمل، ومع نهاية عام ١٩٨٤،أصبحت التجارب الإكلينيكيـــة بـــالعلاج بالجين للمرضى البشر وشيكة الحدوث، إلا أنه قد ظهـــرت عقبـــة لـــم تكـــن متوقعة،عندما اكتشف الباحثون أن الجينات التى أدخلوها فى خلايا الحيوانـــات الحية،بطرق مشابهة للطرق التى تم استنباطها للعلاج بالجين البشرى،لم تستطع فى غالب الأحوال أن تعطى كميات وفيرة من البروتينات النشطة.

ومحاولة استخدام طرق نقل الجين gene transfer مـــع المرضـــى ســـتكون محاولات عديمة الجدوى،وحتى غير أخلاقية، إن لم يكن هناك توقـــع معقـــول لعمل الجين الجديد بصورة جيدة، وعلى الرغم من ذلك،فلم تعط كل تجارب نقل الجين نتائج سيئة، ففى عدد قليل منها،وجد أن الجينـــات المدخلـــة حـــديثاً فـــى حيوانات التجارب جينات نشطة،على الرغم من أن كميات البروتين التى أنتجتها هذه الجينات لم تكن بالقدر الكافى لتصحيح العيـــب الـــوراثى، وعـــلاوة علـــى ذلك،وجد أن الجينات المنقولة تصحح عيباً جينياً فى الخلايا البشرية التـــى تـــم استزراعها فى المزرعة، ومع منتصف عام ١٩٨٦، أصبح الباحثون مستبشرين مرة أخرى بأن يكون فى إمكانهم التغلب على مشاكل تعبير الجين،وأن يكـــون العلاج بالجين البشرى فى النهاية مجالاً مطروقاً .

الأمراض المرشحة للعلاج بالجين

Candidates for gene therapy

الأمراض الوراثية التى تعتبر حالياً من أفضل الأمراض المرشحة للعـــلاج بالجين،هى الأمراض التى يمكن أن يصحح فيها عيب وراثى،عن طريق إدخال جين سليم جديد إلى خلايا نخاع العظم bone marrow cells، ويشكل نخاع العظم الذى يعتبر النسيج الإسفنجى الطرى فى تجاويف معظم العظام كلاً من خلايـــا الدم الحاملة للأكسجين والأنواع العديدة من خلايا الدم البيضاء التـــى يتطلبهـــا الجسم لزيادة الاستجابات المناعية الفعالة، ويمكن التخلص من خلايـــا النخـــاع بسهولة من شخص، بسحبها بواسطة إبرة مجوفة،يتم إدخالها فى ظهـــر عظـــام الورك. ويمكن الاحتفاظ بهذه الخلايا فى أطباق المعمل أثناء إجراء المعالجـــات

المطلوبة لإدخال جين جديد،وبعد ذلـــك يــتم حقنهـــا بســـهولة فـــى وريـــد دم المريض،ومنه تعود إلى نخاع العظم نفسه.

ومن بين الحالات التى قد يمكن تصحيحها عن طريق نقل الجين إلى خلايا نخاع العظم نقص فى إنزيمين ،يؤدى كل منهما إلى استجابات مناعية منقوصة بشكل حاد ،وإلى الوفاة فى مرحلة عمريـــه مبكـــرة، والإنزيمـــان الناقصـــان هما،أدينوسين دميناز(ADA) وبورين نكليوسيد فسفوريلاز(PNP)،اللذان يعتبران جزء من المسار الكيميائى الحيوى نفسه لتخليق قواعد البورين، وهما المطلوبان من بين أشياء أخرى كوحدات بنائية للأحماض النوويةnucleic acids(شكل ١٥-١). ويؤدى النقص فى أى من هذين الإنزيمين إلى تراكم المركبات،والتى على الرغم من وجودها بتركيزات منخفضة فى الخلية بصورة طبيعية،إلا أنها تصبح سامة عند ازدياد تركيزها.

شكل ١٥ ــ ١ أيض البورين، تعتبر إنزيمات أدينوزين ديمناز (ADA) وبورين نكليوسيد فوسفوريلاز (PNP) وهيبوكسانثين جوانين فوسفوريبوسيل ترانسفيراز (HPRT) جميعا جزء من مسار أيض البورين، حيث يحول إنزيم الـ ADA الأدينوزين إلى أينوزين بإزالة المجموعة الأمينية من قاعدة البورين،ويزيل الـ PNP الريبوز من أينوزين،ونتيجة لذلك،ينتج قاعدة هيبوكسانثين خالية من البورين،ويحول الـ HPRT ريبوز الفوسفات من فوسفوريبوسيل بيروفوسفات (PRPP) إلى هيبوكسانثين وجوانين،وبذلك ينتج أينوزين مونوفوسفات وجوانوسين مونوفوسفات.

ومن المتوقع أن يجرب العلاج بالجين أولاً مع المرض الناشئ عن نقص أدينوسين ديمناز، الذي يصيب حوالى مائة طفل على مستوى العالم، أما المرض الناشئ عن نقص بورين نكليوسيد فسفوريلاز، فيعتبر من الأمراض النادرة الحدوث جداً- حوالى عشر حالات أو نحو ذلك قد تم التعرف عليهم على مستوى العالم-ولا يلقى اهتماماً كبيراً من أبحاث العلاج بالجين.

وعلى الرغم من أن خلايا جميع الأفراد الذين يعانون من نقص فى أدينوسين ديمناز أو بورين نكليوسيد فسفوريلاز تفشل فى صنع الإنزيم المطلوب،فالأنواع

الوحيدة التى ظهر أنها تعانى من تأثيرات خطيرة،هى الخلايا اللمفيةTو B،وهى الخلايا اللازمة لصنع الاستجابات المناعية الطبيعيـــة، وكنتيجــة لــذلك،تموت خلاياTو B،ولا يستطيع المرضى مقاومة العدوى،ويموتون بسبب هذا الــنقص خلال السنوات الأولى القليلة من حياتهم، ولما كانت الخلايا اللمفيةTو B مــن بين الخلايا التى تنشأ فى نخاع العظم،فمن المحتمل علاج العجز الناشــئ عــن نقص إنزيمات الـــــADA أو الــــPNP، إذا أمكن إدخال نسخة نشــطة مــن الجين المناظر إلى نذيرى[١] الخلايا اللمفيةT و B فى نخاع العظم.

ولا يمكن إجراء العلاج بالجين دون وجود الجينات نفسها، وقد تــوفر هــذا الشــرط بالنســبة لــنقص أنزيمــيADA و PNP ، حيــث تــم استنســاخ جيناتADAوPNP البشرية ، وهى لذلك متوفرة لإدخالها فى خلايا نخاع العظم، وعلاوة على ذلك،فهناك دلالة على أن هذه الاستراتيجية سيكتب لها النجاح، قــد جاءت من النجاح الذى حدث فى استزراع نخاع العظم لعلاج المرضى الــذين يعانون من نقص شديد فى المناعة الوراثية، التى تشمل النقص الناشئ عن الـــ ADAوPNP، وهذا يوضح أنه من خلال وجود نخاع عظم قادر علــى صــنع خلايا Tو B سليمة،فإنه يعتبر كافياً لإبطال الأعراض التى يشكو منها المريض، ولا تحتاج الأنواع الأخرى من خلايا الجسم للعلاج.

وعلى الرغم من أن زرع نخاع العظم يمكــن أن يعــالج قصــور المناعــة الوراثى،إلا أنه لا تزال هناك علاجات بديلة مطلوبــة ، ووفقــا لروبرتســون باركمانRobertson Parkman من مدرسة الطب التابعة جامعة جنوب كاليفورنيا

[١] ـــ التنذير : هو الشيء الذى يحدث أو يوجد قبل شيء آخر ويؤثر على تطوره. (المترجم)

ومستشفى الأطفال بلوس أنجلوس،الذى صرح بأن اســتخدام عمليــات الــزرع سيكون محدوداً،بسبب قلة الأشخاص الواهبون لنخاع العظم، حيــث يجــب أن يتوافق الشخص الواهب لنخاع العظم جينياً مع المريض المتلقى ،حتى لا تتعرف الخلايا المناعية الناتجة من نخاع العظم المزروع(المغروس) علــى أن أنســجة المريض خلايا غريبة وتوجه إليها هجوما مناعيا. هذا الهجــوم الــذى يســمى بـــــمرض رفض العائل للطعم"graft-versus-host"، يمكن أن يسبب تلف شديد بالأنسجة ويؤدى إلى وفاة المريض فى النهاية .

والموقف المعاكس،ألا وهو رفض الجهاز المناعى للمريض لغرس مخ عظم غريب،لا يعتبر مشكلة كبيرة، فمعظم الأفراد الذين يجرى لهــم عمليــات زرع لنخاع العظم،يعالجون فى البداية بالإشعاع أو العقاقير لتدمير الخلايا المكونة للدم فى نخاع عظمهم، ويتم هذا الإجراء أساساً لإفساح المجال للخلايــا المنزرعــة ؛وإلا فإنها لن تتمكن من ترسيخ نفسها فى نخاع العظم،حيث لا يمكنها التغلــب على الخلايا الموجودة، فى حين يكون للعلاج بالإشعاع أو العقار تــأثير أيضــاً على كبح الاستجابات المناعية للمريض.

غير أن المرضى الذين يعانون من نقص الـــــADA لا يحتاجون إلى علاج أولى بالإشعاع، فبسبب القصور الحادث فى الجهاز المناعى،لا يستطيعون شــن هجوم رفضى فعال، وعلاوة على ذلك،فأى خلايــا منزرعــة ذات جــينADA نشط،يجب أن يكون لها ميزة اختيارية قوية على الخلايا الموجــودة المفتقــرة للإنزيم، وجميع المرضى الذين يجرى لهم عمليات زرع،يداوون بعقاقير كابحة للمناعة لتقليل احتمال ظهور أمراض رفض العائل للغرس ولرفض الغرس.

ويكون معظم واهبو نخاع العظم من الأشخاص المقربين للمريض،وعادة مـ يكون أخ أو أخت، يشابه تماماً تركيبه الوراثى التركيـب الـوراثى للمـريض. وحسب تقدير باركمان Parkman فإن نسبة المرضى الذين قد يسـتفيدون مـ عمليات غرس نخاع العظم ويجدون واهبون مناسبون لا تزيد عن ٣٠% ،وحتى فى حالة وجود توافق بين المريض والواهب،فإن مـا بـين ١٠ و٢٠% مـ المرضى الذين أجريت لهم عمليات غرس نخاع العظم،يموتون بمرض رفـض العائل للغرس فى غضون سنة من عملية الغرس، ولا يسبب مـرض رفـض العائل للغرس مشكلة للمرضى،الذين أعيدت لهم خلايا نخاع العظم بعد عـلاج عيوبها بواسطة نقل الجين.

وهناك حالة ثالثة يتكرر ذكرها بأنها مرشحة أولى محتملة للعلاج بالجين،ألا وهى أعراض ليسك-نيهانLesch-Nyhan syndrome،التى تنشأ نتيجـة نقـص إنـزيم هيبـوزانثين-جـوانين فسفوريبوسـيل hypoxanthine-guanine phosphoribosyl(HPRT). وقد تم أيضاً استنساخ جينHPRT البشرى، وعلـى الرغم من أن هذا الإنزيم يعتبر جزء من المسار التخليقى نفسه مثل الـADA وPNP(انظر شكل ١٥-١)،فإن نقص إنزيمHPRT،يسبب سلسـلة أكبـر مـن الأعراض عن تلك التى يسببها نقص الإنزيمين الآخرين، ويحـدث للمصـابين بمرضLesch-Nyhan syndrome، تركيز عال فى دمائهم من حمض البوليك uric acid ،الذى ينشأ عن تخليق مفرط من البورينات(أسـاس مجموعـة مركبـات حمض البول)،ويسبب النقرس وتلف بالكليتين.

ويمكن أن يقلل العلاج التقليدى تركيز حمض البوليك فى الـدم،ويمنع تلـف الكليتين،التى كانت تؤدى إلى وفاة المرضى فى مرحلة عمرية مبكـرة، وعلـى

الرغم من العلاج،يعانى المرضى من مشاكل عصبية خطيرة غير قابلة للعلاج أيضا فى الوقت الحالى،وتشمل تدهور القوى العقلية والشلل المخيcerebal palsy وربما الأكثر سوء،نزوعهم إلى جذم أنفسهم،إن لم يكفوا عن ذلك برادع مادى.

والسؤال الذى يبحث عن إجابة،هو هل سيؤدى إدخال نسخة سليمة من جينHPRT فى نخاع العظم إلى تخفيف الأعراض العصبية التى تعتبر أعراض مجهولة السبب، فإذا كان نقص الجين يسبب بعض التغيرات الداخلية فى التركيب البنيوى أو الكيميائى الحيوى لأعصاب المخ،فلا يحتمل أن يكون لإدخال إنزيمHPRT فى نخاع العظم فائدة كبيرة، ولكن إذا كانت الأعراض العصبية تنشأ نتيجة لإنتاج مادة كيميائية سامة،فإن إنزيمHPRT فعال حتى ولو لم يكن موجوداً فى المخ،فقد يستطيع تخفيض تركيز المادة الكيميائية بدرجة كافية للتخفيف من حدة الاضطرابات العصبية.وهناك نتيجة بحث مشجعة تتعلق بالعلاج بالجين المحتمل لمجموعة أعراض مرضLesch-Nyhan،هى ملاحظة أن الأفراد الذين لديهم قصور جزئى فقط فيHPRT، لديهم تركيز متزايد من حمض البوليك والنقرس، ولا توجد لديهم أعراض عصبية، ونتيجة البحث الأقل تشجيعاً هى التى جاءت فى تقرير باركمان وهى أنه لم يحدث تحسناً إكلينيكياً لمريض Lesch-Nyhan،الذى أجرى له حتى الآن عملية زرع نخاع العظم،بالرغم من أن خلايا الدم البيضاء للمريض أنتجت كميات طبيعية من الـHPRT بعد عملية الزرع ، وربما يكون المريض قد فشل فى الاستجابة حيث لم تصل تأثيرات الإنزيم إلى المخ، وهناك احتمال آخر وهو أن عملية الزرع قد تمت فى وقت متأخر،بعد أن حدث تلف بالمخ يتعذر علاجه، وبسبب

التشعبات العصبية لمجموعة أعراض مرض الـــــLesch-Nyhan،فربما يكـــون من الأمراض الأقل قابلية للعلاج بالجين عن علاج نقص الـــــADA أوPNP.

ويبدو من الوهلة الأولى، أن أمراض الأنيميا الوراثيـــة،مثل أنيميـــا الخليـــة المنجلية أو الثالاسيميات،هى من أفضل الأمراض المؤهلة لتلقى العلاج بالجين، فالعيوب التى تؤثر على تشفير الجينات لإنتاج بروتينات الهيموجلوبين قد قتلـــت بحثاً وفهماً، وتم استنساخ الجينات المطلوبة، وتم زرع الخلية التى تعبر فيها هذه الجينات بصورة محددة فى نخاع العظم، والمشكلة هى أن تنظيم جينات الجلوبين تعتبر أكثر تعقيداً من جينات الـــــADA وPNP وHPRT.

تعتبر إنزيمات الـــــADA وPNP وHPRT، الإنزيمـــات المـــدبرة لشـــئون الجسم،والتى تصنع على الدوام فى جميع الخلايا، والتى يبدو أنها قـــادرة علـــى تحمل التغير فى المقدار الذى تنتج به، وفى المقابل،لا تنتج بروتينات الجلـــوبين إلا فى أحد أنواع الخلايا المتخصصة ،وهى الخلية التـــى تنـــتج خلايـــا الـــدم الحمراء،وفى توقيت معين من دورة حياة هذه الخلية، وعلاوة على ذلك،يحتوى جزيء الهيموجلوبين الناضج على بروتينين مختلفين، ويكون تعبيـــر الجينـــات المناظرة،التى تقع على كروموسومات مختلفة متناسقا بحيث تنـــتج البروتينـــات بكميات متساوية تقريباً.

ولم يستطع أحد حتى الآن أن يجرى تنظيماً طبيعياً لجينات الجلوبين بصورة كاملة،والتى تم نقلها إلى الخلايا المستزرعة، والجينات المنقولـــة، علـــى وجـــه الخصوص، تصنع مقادير صغيرة جداً من المنتج، وسوف يتطلب علاج أمراض الأنيميا إنتاج الهيموجلوبين بكميات شبه طبيعية، وحتى يتم الانتهاء مـــن حـــل

مشكلة تنظيم جين الجلوبين،فلن يكون العلاج بالجين لأنيميـــا الخليـــة المنجليـــة وأمراض الأنيميا الوراثية الأخرى علاجاً مجدياً .

ولا تزال هناك أمراض أخرى ذات أصول جينية،غير مؤهلة حالياً للعـــلاج بالجين،وقد لا يحدث ذلك قبل عدة سنوات ،هذا إن حدث ، وينطبق الحال علـــى أى حالة لم يتم تحديدها واستنساخ جيناتها، وعلى سبيل المثال، تتصف مجموعة أعراض مرضWiskott-Aldrich،بشذوذ فى الخلايا اللمفية ولويحات الدم blood platelets،ويمكن علاجها بعمليات زرع نخاع العظم،والتـــى يبـــدو أن العـــلاج بالجين سينجح معها أيضاً-لكن العيب الجينى لم يتم تحديده بعد، ومرض تليـــف البنكرياس الحوصلى، هو حالة أخرى من حالات الأمراض الوراثية التـــى لـــم يصل فيها الباحثون إلى رأى قاطع حتى الآن بالنسبة للجين المصاب،على الرغم من أنهم كادوا يقتربوا من الحل(انظر الفصل الرابع عشر)، وعلى الرغم مـــن ذلك، يتطلب العلاج بالجين كما يخيل للباحثين الآن أن يكون الحصـــول علـــى الجين النشط المناسب من الخلايا المشتقة من نخاع العظم كافيا للتخفيـــف مـــن أعراض المرض، ولن ينجح العلاج مع مرض تليف البنكرياس الحوصلى الذى يصيب العديد من أعضاء الجسم،وعلى وجـــه الخصـــوص، الرئتـــان والكبـــد والبنكرياس.

طـــرق نقـــل الجيـــن

Gene transfer methods

على مدى السنوات العديدة الماضية، طور الباحثون بعض الطرق لإدخـــال جينات جديدة فى الخلايا،وفى واحدة من الطرق المبكرة جـــداً وربمـــا أكثرهـــا بساطة ،تم تحضين خلايا مستزرعةcultured cells مع راسب فوسفات الكالسيوم من د.ن.أ. ولاحظ فرانك جراهامFrank Graham وأليكس فان دراب Alex van der Ebمن جامعة مكماستر فى هامليتون بأنتريو،أن هذه المعالجـــة للـــــ د.ن.أ تسهل أساساً امتصاص الخلايـــا للحمـــض النـــووى، وأخيـــراً، قـــام ميشـــيل ويجلرMichael Wigler الذى يعمل حالياً فى معمل كولد ســـبرنج هـــاربر فـــى جزيرة لونج التابعة لنيويورك، وريتشارد أكسلRitchard Axel وسول سلفرشتين Saul Silversteinمن كلية الأطباء والجراحين بجامعة كولومبيا،بتعديل الطريقـــة كى تستخدم فى إدخال جينات مستنسخة فردية فى الخلايا، ويمكن أن يندمج الـــ د.ن.أ الممتص بهذه الطريقة فى مجموعة العوامل الوراثية للخليـــة المســـتقبلة للراسب،ويمرر من ذرية الخلية(أى يمرر إلى الخلايا التى ســـتتولد مـــن هـــذه الخلية).

غير أن عدداً قليلاً جداً من الخلايا المحضنة مع رســـابة الــــــ د.ن.أ،قـــد امتصت المادة بالفعل. وفى أفضل الأحوال كانت واحدة فقط من كل ١٠٠ إلـــى ١٠٠٠ خلية هى التى امتصت المادة،وبكفاءة أكثر نموذجية كانت واحدة من كل ١٠٠٠٠٠إلى ١٠مليون خلية(التى امتصت المادة)، وتعنى الكفاءة المنخفضة أنه يجب أن تستخدم طريقة اختيار للتعرف على الخلايا النادرة التى تكتسب الـــــ

د.ن.أ الغريب، ويتضمن هذا عادة على نقل جين يضفى نــوع مــن الميــزات الممكن تحديدها على الخلية التى تمتص المادة، وجين كهذا قد يشفر عن مقاومة لمضاد حيوى،على سبيل المثال، ولا تنمو الخلايا إلا التى تكتسب الجــين فــى وجود المضاد الحيوى،بينما ستموت بقية الخلايا الأخرى، وغالباً مــا يرغــب الباحثون فى نقل جين لا يضفى ميزة اختياريةselectable advantage،ويمكــن القيام بهذا ببساطة بنقله مع أحد الجينات التى تضفى الميزة.

وقد أثبتت طريقة فوسفات الكالسيومcalcium phosphate method فائدة كبيرة جداً فى دراسات تحكم تعبير الجينgene expression، حيث ساعدت على ســبيل المثال، فى تحديد قطع الــــ د.ن.أ التى تنظم نسخ الجين فى ر.ن.أ الرســول، ويستطيع الباحثون بمساعدة الــ د.ن.أ المطعم إلغاء أو تبديل قطع د.ن.أ معينة داخل وحول جين،ثم يلاحظوا بعد ذلك كيف تؤثر التغييرات على نسخ الجين بعد أن تنتقل التسلسلات المتغيرة(المبدلة) إلى الخلايا المستزرعة بواســطة طريقــة فوسفات الكالسيوم.

وعلى الرغم من القيمة الثابتة بالتجربة لتوسط فوسفات الكالسيوم فــى نقــل الجين فى مجال البيولوجيا الجزيئية الأساسية،إلا أن كفاءتها المنخفضة جعلتهــا غير مناسبة للاستخدام فى العلاج بالجين، ويتكون نخاع العظم مــن مجموعــة مختلطة من الخلايا فى مراحل نمو مختلفة،ولكى ينجح العــلاج بالجين،يجــب إدخال الجين الجديد إلى مجموعة فرعية معينة من الخلايا،أى التى مــن خليــة "جذعية" بدائية primitive stem cell، وللخلايا الجذعية القدرة على إنتــاج كــل ذريات الخلايا الرئيسة التى تنشأ فى نخاع العظم(شكل ١٥-٢)، وعندما تنقســم الخلايا الجذعية، فإنها تكوّن ذرية تتمايز على طول مســارات عديــدة،وتتطور

بعض الخلايا التى تنحدر منها خلايا الدم الحمراء،بينما يكون البعض الآخر الأنواع العديدة من خلايا الدم البيضاء، ويمكن تشبيه عملية التمايزdifferentiation بشارع ذى اتجاه واحد؛فلا تستطيع الخلايا العودة للخلف خلال مسيرتها نحو النضج. وهى تفقد قدرتها أيضاً على الانقسام.

وإذا دخل جين منقول فقط إلى الخلايا الناضجة لسلالة معينة،فسوف يضل طريقه فى نهاية الأمر عندما تموت تلك الخلايا الواحدة بعد الأخرى، ومع ذلك،فإذا كان الجين فى الخلايا الجذعية،فسوف تستمر فى إعادة تزويد نخاع العظم والدم بخلايا تحمل الجين المنقول، والمشكلة هى أن واحدة من كل ١٠٠ إلى ١٠٠٠فقط من خلايا نخاع العظم ،هى خلية جذعية، وقدّر و.فرنش أندرسون من معهد القومى للقلب والرئة والدم(NHLBI) فى بتسدا،بولاية مريلاند،أن حوالى من ١٠ إلي١٠٠ خلية جذعية فقط من عينة نخاع عظم نموذجية سوف تكتسب جيناً بواسطة طريقة فوسفات الكالسيوم، لو كانت كفاءة النقل واحد فى المليون، ويحتوى نخاع العظم الكلى لأى شخص على ما يقرب من ١٠٠مليون إلى بليون خلية جذعية،وبإعادة إدخال عدد قليل كهذا من الخلايا المتحولة وراثياً،لن يحتمل أن يكون له أى تأثير ملحوظ،إلا إذا كانت لها ميزة انتقائيةselective advantage هائلة تفوق على مجموعة الخلايا غير المتحولة.

papain-Cys25-CH2-SH + BrCH2-C(=O)-[flavin]

↓

papain-Cys25-CH2-S-CH2-C(=O)-[flavin]

'Flavo-papain'

شكل ١٥ ـ ٢ تمايز الخلايا الجذعية لنخاع العظم،لأية خلية جذعية غير متمايزة القدرة على إنتاج جميع أنواع خلايا الدم الرئيسة ،التى تشتمل : خلايا الدم الحمراء(erythrocytes) والخلايا الضخمة (megakarytes) التى تنتج اللويحات اللازمة لتجلط الدم، وأليفات الإيوسين(eosinophiles)،وهى خلايا الدم البيضاء التى تحتوى على حبيبات التى تصبغ بصبغ أيوسين أحمر ، والكريات المحببة(granulocytes) وهى نوع آخر من خلايا الدم البيضاء المحتوية على الحبيبة، والملتقمات الكبرى(macrophages) والتى سميت بذلك،لأنها الكاسحات التى تبتلع وتأكل مولدات المضاد الغريبة والخلايا التالفة أوالشاذة ،و الخلايا اللمفيةTوB. ويدل الرمزCFU-S على وحدة تشكيل مستعمرة طحال ويدل على نوع غير ناضج من الخلايا التى تكون مستعمرات فى الطحال، ويكون سبب فى سلاسل الخلايا العديدة الموضحة، وترمز الـBFU-Es إلى وحدات ضاربة للحمرة متكونة بشكل متفجر،وهى خلايا أكثر تمايزا إلى حد ما،والتى لا تحدث إلا خلايا الدم الحمراء. وتدل الرموز CFU-E,-Meg,-Eo على أنواع من الخلايا التى لا تزال أكثر تمايزاً، و تنتج على التوالى خلايا الدم الحمراء،والنواءات واللويحات وأليفات الإيوسين والكريات المحببة والملتقمات الكبرى.

ولهذا السبب ركز الباحثون المهتمون بتطوير العلاج بالجين جهودهم على استنباط وسائل أكثر فاعلية لنقل الجينات إلى الخلايا بطريقة فوسفات الكالسيوم، فقد تحولوا إلى الفيروسات،التى لها على الأقل من الناحية النظرية القدرة على إصابة كل الخلايا الموجودة فى عينة ما، وقد استخدموا الفيروسات الارتجاعية[٢]retroviruses، على وجه الخصوص التى تستخدم الـ ر.ن.أ كمادة وراثية لها.

[٢]ـ الفيروسات الارتجاعية:هى أى مجموعة من الفيروسات التى تحتوى على جديلة واحدة من ر.ن.أ من عائلةRetroviridae والتى لها غلاف حلزونى،وتحتوى على إنزيمreverse transpcriptase،الذى يمكّن المعلومات الوراثية من ر.ن.أ الفيروسى لأن تصبح جزء من د.ن.أ العائل. (المترجم)

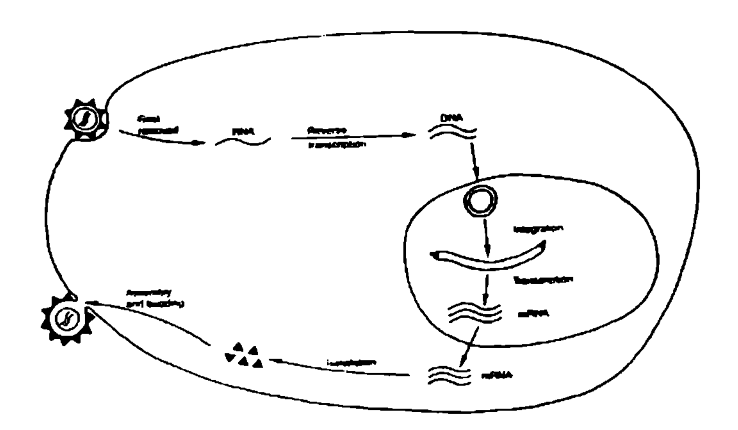
ودورة حياة الفيروسات الارتجاعية تجعل منها أكثر ملاءمة لاستخدامها كحمالات vehicles لنقل الجين(شكل ١٥-٣)، وعندما يصيب أحدها خلية،فإن الإنزيم الفيروسى ريفرس ترانسكربتاز reverse transcriptase يصنع نسخة د.ن.أ من مجموعة العوامل الوراثية ر.ن.أ للفيروس، ويمكن أن يدخل الـ د.ن.أ نفسه فى مجموعة العوامل الوراثية لخلية العائل،ويظل هناك بصفة مستديمة،وينتقل إلى الذرية إذا ما انقسمت الخلية ، ويكون الـ د.ن.أ المتكامل محاطاً عند كل طرف بواسطة تسلسلات متطابقة تسمى بـالتكرارات الطرفية الطويلة long terminal repeats (LTRs)،التى تحتوى على الإشارات المطلوبة لنسخ الجينات الفيروسية فى الـ ر.ن.أ (شكل ١٥-٤)، وتعمل جزيئات الـ ر.ن.أ الناتجة بهذه الطريقة، كرسل ر.ن.أ لصنع البروتينات الفيروسية، وتعمل أيضاً كمجموعة عوامل وراثية للجزيئات الفيروسية المتكونة حديثاً .

وسوف ينسخ الجين الغريب أيضاً الذى تم إدخاله فى مجموعة العوامل الوراثية الفيروسية فى ر.ن.أ الرسول فى الخلايا المصابة تحت تأثير الـLTRs،وطورت مجموعات عديدة من الباحثين متجهات فيروسية ارتجاعية لنقل الجين، والفيروس الأكثر استخداماً لهذا الغرض هو فيروس مولونى سرطان الدم الفأرى Moloney mourine leukaemia virus(MMLV)،والذى كما يدل عليه اسمه يسبب سرطان الدم فى الفئران، إلا أن هذا الفيروس لا يسبب سرطان للدم إلا فى ظل حالات خاصة جداً،عندما تحقن الحيوانات الوليدة بكميات كبيرة من هذا المعامل، ولا ينمو السرطان فى الحيوانات إذا حقن

للفيروس فى فترة متأخرة من عمر الحيوان،على الرغم من أنها تصبح حاملة للفيروس.

والسبب الذى يجعل فيروس مولونى سرطان دم الفأر يسبب سرطان الدم لا يزال غير واضح، فهو لا يحتوى على أى من جينات مسببة للسرطان تعرف بأنها مسرطناتoncogenes ، وهذه الجينات من مصدر خلوى ويساعد شكلها الطبيعى على التحكم فى نمو الخلية وتطورها، ومع ذلك، يمكنها أن تأخذ صوراً ملتوية، ويحتمل أن يكون السبب فى ذلك نتيجة للتغيرات التركيبية التى تجعلها تصنع منتجات شاذة أو تصنع منتجاتها فى الوقت غير المناسب من دورة حياة الخلية، ويمكنها حينئذ أن تحدث نمواً غير محكم والصفات الأخرى للخلايا الخبيثة، واكتشفت المسرطنات لأول مرة فى فيروسات معينة تسبب السرطان فى الحيوان،والتى يبدو أنها تتعرف عليها فى الخلايا المصابة.

ولا يفضل الأطباء الممارسون إعطاء المرضى فيروساً ارتجاعياً،يكون قادرا على تكرار نفسه والانتشار إلى خلايا أخرى،وخصوصا حتى لو كانت لهذا الفيروس إمكانية محدودة لإحداث السرطان. ونتيجة لذلك،فإن مجموعة العوامل الوراثية لفيروسMMLV التى استخدمت كمتجهات لنقل الجين،قد تم تعديلها،بحيث لم يصبح الفيروس قادرا على أن يتناسل لكى يصنع الجزيئات المعدية،لكنه يحتفظ بقدرته على الدخول إلى الخلايا المستهدفة،وإيلاج معلوماته الوراثية فى داخل مجموعة العوامل الوراثية الخلوية.



شكل ١٥ ـ ٣ دورة حياة فيروس ارتجاعى، يدخل الفيروس المعدى الخلية المستهدفة،حيث يزال الغلاف الفيروسى ،وينفك يحرر مجموعة العوامل الوراثية ر.ن.أ. وهذه المجموعة تستنسخ أولا إلى نسخة د.ن.أ، والتى تنسخ نفسها إلى شكل من د.ن. ذو جديلة مزدوجة. وبعد أن يكون هذا الجزيء حلقة غلقه يصبح مجموعة عوامل وراثية خلوية، حيث يستنسخ إلى جزيئات ر.ن. رسول مع الجينات الأخرى للخلية ، وتتحول جزيئات ر.ن.أ الرسول الفيروسية لتنتج البروتينات العديدة المطلوبة لصنع جزيء فيروسى معدى.بعد ذلك يتجمع الـ ر.ن.أ الفيروسى مع البروتينات فى صورة فيروس كامل،الذى يتبرعم من الخلية لإفراز فيروس معدى طليق .

LTR		gag	pol	env	LTR

LTR			Cloned DNA	LTR

LTR	gag	pol	env	LTR

شكل ١٥ ـ ٤ فيروس سرطان دم فأرى مولونى ومتجه، يمثل القضيب العلوى تمثيلا تخطيطيا لمجموعة العوامل الوراثية لفيروس سرطان الدم الفأرى مولونى ، وعلى الأطراف توجد التكرارات الطرفية الطويلة(LTRs)،التى تحتوى على التسلسلات المطلوبة لتحويل نسخة الـ د.ن.أ للـ ر.ن.أ الفيروسى إلى مجموعة عوامل وراثية للخلية العائلة ،وأيضا للتحكم فى نسخ الجينات الفيروسية. ويمثل القضيب الأسود التسلسل المطلوب لتجميع مجموعة العوامل الوراثية الفيروسية فى صورة جزيئات فيروسية معدية كاملة، وترمز مناطق الـ gag و pol و env على التوالى إلى الجينات المشفرة عن ا لبروتينات الفيروسية الأساسية ،و ريفرس ترانسكربتاز. والبروتينات الغلافية، ولعمل متجهات لنقل الجين،فإن معظم التسلسلات الفيروسية،باستثناء الـ LTRs وتسلسل التجميع(التحزيم)،تستبدل بالجين أو الجينات المستنسخة التى ستنقل ، والفيروس المساعد(helper)،الذى يصنع البروتينات المطلوبة لتجميع المتجه فى صورة جزيئات معدية،يحتفظ بجينات gag و pol و env؛ومع ذلك يحذف تسلسل التجميع بحيث لا يمكن تتحد مجموعة العوامل الوراثية المساعدة فى صورة جزيئات معدية.

وتحمل مجموعة العوامل الوراثية لفيروسMMLV مثل معظم الفيروسـات الارتجاعية الأخرى ثلاث جينات رئيسة هى :جينpol، الذى يشفر عن ريفرس ترنسكبتاز، وجين env،الذى يشفر عن بروتينات الغلاف الفيروسى الخـارجى، وجينgag،الذى يشفر عن البروتينات الداخلية للمادة الفيروسية (شـكل ١٥-٤). ولعمل المتجهات،اعتادت تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم علـى تشـكيل هـذه الجينات الثلاثة وإحلالها محل أى جين يرغب الباحث فى نقله-جين ADAأو جين HPRT على سبيل المثال، وقد يمكن أيضاً دمج جين يشفر عن المقاومـة لمضاد حيوى أو عن خاصية اختيارية أخرى فى مجموعة العوامـل الوراثيـة للمتجه لإضافة ميزة اختيارية للخلايا التى تحتوى عليه.

ولا تعتبر المقادير الفيروسية الضئيلة جداً من جزيئات الـ د. ن.أ أو الـــ ر.ن.أ معدية، حيث يجب أن تتجمع فى صورة جزيئات فيروسية كاملـة لكـى تدخل الخلايا بصورة فعالة ، ولا يستطيع متجه د.ن.أ الفيروسى الارتجاعى أن يجمع نفسه،لأنه لم يعد يحتوى على الجينات التى تصنع البروتينات الفيروسـية الأساسية، ولكى ينتج المتجه المعدى،فإنه يجرى إدخال الـــ د.ن.أ الفيروسـى المطعم بطريقة فوسفات الكالسيوم إلى سلالة من الخلايا تحمل فيروس"المساعد"، الذى يشفر عن البروتيناتgag و pol وenv، وعادة ما يتم تجميـع كـلاً مـن الفيروس المساعد والفيروس المتجه فى الجزيئات المعدية فى ظل هذه الظروف، ولا يعتبر هذا مرغوباً لأنه لا توجد وسيلة لفصل الفيروسين عن بعضهما،و لو أدخل كلا الفيروسين إلى خلايا نخاع العظم،فإنها تتكاثر هناك وتنتشر.

إلا أنه يمكن منع تكوين الفيروس المساعد، حيث جاء التطور الرئيس فى عام ١٩٨٣،عندما أقر دافيد مانDavid Mann وريتشارد ملجيانRitchard Mulligan

ودافيد بالتيمور David Baltimore من معهد ماسوشيوســتس للتكنولوجيــا فـــى كمبردج بولاية ماساشوستس،بأن مجموعات العوامـــل الوراثيـــة للفيروســـات الارتجاعية تحمل تسلسلا الذى يقع بالقرب من التكرار الطرفى الطويل الأيســـر وجينgag،و يكون ضرورياً من أجل تجميع الـــــ ر.ن.أ الفيروسى فى صورة جزيئات كاملة ، فإذا ازيل التسلسل التجميعى من ر.ن.أ الفيروس المســـاعد،فلا يمكنه أن يصنع جزيئات فيروسية سليمة،ونتيجة لذلك،فإن المادة المعدية الوحيدة التى تخرج من الخلايا،هى متجه فيروس التضاعف المعيب.

وقد طور باحثون من معامل عديدة هذه المتجهات واستخدموها فـــى إدخـــال عدة أنواع من الجينات الغريبة داخل الخلايا المستزرعة،بما فيها خلايـــا نخـــاع العظم، وعلى سبيل المثال، فقد أدخل مليجانMulligan وزملاؤه جيناً يشفر عن المقاومة لمضاد الحيوى النيوميسينneomycin فى داخـــل خلايـــا مـــخ عظـــم الفأر،وعمل تيودور فرديمانTheodore Friedman وزملاؤه فى جامعة كاليفورنيا فى سان دييجو مع Inder Verma و A. Dusty Miller من معهد ســـالك فـــى لا جولا بكاليفورنيا، فى إدخال جينHPRT فى خلايا مخ عظـــم الفأر،واســـتطاع الجين المنقول أن يعبر،على الرغم من أنه فى ذلك الوقت،لم يكن من المستطاع تحديد ما إذا كان نشطا فى الخلايا الجذعية.

وعلى الرغم من النجاحات التى حدثت مع الخلايا المســـتزرعة،فقد كانـــت النتائج فى أغلب المرات مثيرة للإحباط،عندما أخذ الباحثون يحـــاولون إدخـــال جينات فى مخ عظم الحيوانات الحية، ففى هذه التجارب، كانت تزال خلايا نخاع العظم من الحيوانات،وعادة ما كانت فئران، وتحضن مع متجه فيروسى يحمل الجين المرغوب نقله(شكل ١٥-٥)، ثم يعاد حقن الخلايـــا فـــى الفئران،التـــى

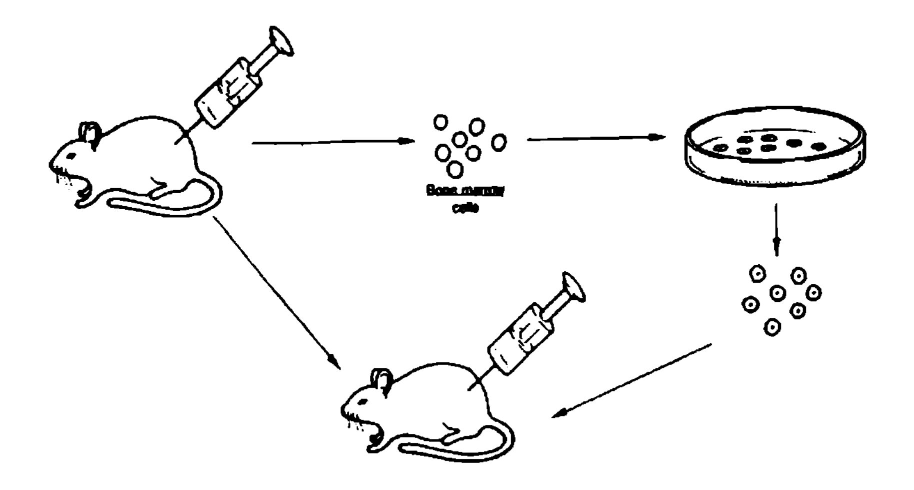
تعرضت لجرعة كافية من الأشعة السينية لتدمير نخاع عظامها، وتعتبر هذه الطريقة من طرق المعالجة القاتلة، غير أن خلايا نخاع العظم المعاد حقنها جددت نخاع الحيوانات مرة أخرى وجعلتها تعيش، ويشبه بروتوكول هذه التجارب،البروتوكول المخطط لمحاولات العلاج بالجين البشرى،بالرغم من أن الأطباء المجربين يأملون فى أن يكون فى مقدورهم تجنب المرحلة التى يدمر فيها نخاع عظم المريض، وبالرغم من ذلك،فقد تكون هذه المرحلة ضرورية،إذا لم تستطع الخلايا المبدلة وراثياً التغلب على مجموعة الخلايا الموجودة فى نخاع العظم.

وعلى أية حال، يستطيع الباحثون الكشف عن الـ د.ن.أ الفيروسى،على الأقل فى بعض الخلايا الناتجة من نخاع العظم المعاد تشكيله فى الفئران،ولكنهم عندما بحثوا عن الإنتاج الفعلى للإنزيمات التى حددتها الجينات المنقولة،فلم يكونوا يجدوها عادة، بيد أنه كانت هناك بعض الاستثناءات، فقد أدخلت ثلاث مجموعات مستقلة ،جين مقاومة النيوميسين فى نخاع عظم الفئران،ووجدت أن المنتج الجينى قد صنع بتركيزات قليلة نسبياً فى أنواع الخلايا العديدة المنتجة من نخاع العظم، وأظهر إنتاج الإنزيم بواسطة أنواع مختلفة من الخلايا المشتقة من نخاع العظم،أن جين المقاومة للنيوميسين قد دخل الخلايا الجذعية وظل نشطاً . والمجموعات الثلاث التى قامت بنقل الجين هى مجموعة ألان برنشتين Alan Bernsteinمن مركز أبحاث مستشفى جبل سيناء فى ترنتو بكندا،الذين تعانوا مع روبرت فيليبسRobert Phillips من مستشفى تلك المدينة للأطفال المرضى، وجوردون كيللر Gordon Kellerمن معهد بازل للمناعة بسويسرا وأيروين وانجرErwin Wagner من معمل البيولوجيا الجزيئية الأوروبية فى هيدلبرج

بجمهورية ألمانيا الاتحادية، و أندرسونAnderson وزملاؤه.وفى الآونة الأخيرة
، استطاع أندرسونAnderson وأرثر نينهيوسArthur Nienhius من معهد
القومى للقلب والرئة والدمNHLBI وريتشارد أوريلليRichard O'Reilly من
معهد سرطان سلوان-كترنج التذكارى فى مدينة نيويورك، أن يحرزوا نجاحاً
أيضاً عندما قاموا بإدخال الجين البشرى ADA فى نخاع عظم قرود حية.
وأنتجت الخلايا المأخوذة من نخاع العظم من خمس من القرود السبعة
المستخدمة الإنزيم البشرى، وعلى الرغم من أن مستويات التعبير،كانت حوالى
١٠% فقط من تلك التى اعتقد أنها ضرورية للتغلب على التأثيرات الناجمة عن
نقص الـADA،فقد كانت النتائج على الرغم من ذلك مشجعة من وجهة نظر
استخدام الطرق فى النهاية للعلاج بالجين البشرى، فعندما حاول مليجان مع دافيد
ويليامزDavid William وستيورات أوركينSturat Orkin من المدرسة الطبية
بهارفارد القيام بنقل مماثل لجين الـADA البشرى إلى الفئران،فلم يتمكنوا من
الحصول على تعبير الجين فى معظم الحيوانات،على الرغم من أنه كان موجوداً
فى خلايا الحيوانات بصورة سليمة وغير معاد ترتيبه.

وعلى الرغم من ذلك،فقد وجدت كلا المجموعتين أن الخلايا اللمفية التى تم
الحصول عليها من المرضى المصابون بنقص الـADA،وتم زراعتها فى
مزرعة،يمكن أن "تعالج" عن طريق إدخال نسخة سليمة من جين الـADA،
ويحمى الإنزيم المنتج بطريقة الجين المنقول الخلايا اللمفية من تأثيرات المادة
الكيميائية السامة التى يمكنها لولا ذلك أن تقتل الخلايا، وتدل النتائج على أنه إذا
أمكن إدخال جينADA نشط إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم،فسوف يكون لها

التأثير المطلوب فى حماية الخلايا اللمفية من التأثيرات القاتلة الناجمة عن نقص إنزيم الوراثة.



شكل ١٥ – ٥ أسلوب العلاج بالجين، تسحب خلايا نخاع العظم من الحيوان الذى سيتلقى العلاج بالجين بواسطة حقنة، بعد ذلك تستزرع الخلايا مع الخلايا التى ستنتج المتجه الفيروسى، الذى سيستخدم فى إدخال الجين الجديد إلى الحيوان، ويتعرض الفأر إلى جرعة من الأشعة السينية التى تقوم بتدمير نخاع عظمه،ثم يعاد حقن خلايا نخاع العظم التى اكتسبت الجين الجديد. ويستخدم أسلوباً مشابهاً لعلاج الأمراض الوراثية البشرية،على الرغم من أن الأطباء المجربين يفضلون تجنب خطوة إعطاء جرعة الأشعة السينية .

والسبب فى توصل بعض الباحثين إلى نتائج أفضل من النتائج التى حصل عليها باحثين آخرين لا يزال غير واضحاً،على الرغم من وجود دلائل بأن الإجابة قد تكمن فى المتجهات، فقد كانت كل من مجموعة أندرسون ومجموعة كيللر ووجنر تستخدم متجها قام باستنباطه أيلى جيلبوا وزملاؤه فى جامعة برنكتون، واستخدم برنشتين وفيليبس متجها أنشآه بأنفسهما،فى حين كان تصميمه يشبه تصميم متجه مجموعة جيلبوا.

وميللرMiller،الذى يعمل حالياً فى مركز أبحاث سرطان فريد هتشنسون فى سيتل،وراندى هوكRandy Hock الذى يعمل بنفس المعهد،ذكرا فى تقريرهما مؤخراً نتيجة مشجعة أخرى مع متجه جيلبوا،الذى قد يقرب العلاج بالجين

البشرى للأمراض الوراثية خطوة للأمام، وقد واجه الباحثون مشاكل فى الحصول على تعبير الجينات المنقولة إلى خلايا نخاع العظم البشرى فى المزرعة، ولكن عندما استخدم ميللر وهوك متجه جيلبوا لنقل أحد جينى المقاومة للمضاد الحيوى داخل الخلايا البشرية،فقد أصيب ما بين ٥%إلى ٢٠%،وأصبحت مقاومة للمضاد الحيوى المناسب ، ولم تستطع مجموعة باحثو سيتل أن يحددوا فى هذه التجارب ما إذا كانت الجينات قد دخلت الخلايا الجذعية، فى حين أن تعبيرها يمكن الكشف عنه فى خلايا نخاع العظم "السلف"،والتى على الرغم من أنها أكثر تطوراً عن الخلايا الجذعية الحقيقية فلا تزال غير ناضجة، وقد استطاع أيضاً برنشتين وفيليبس وزملاؤهما أن يدخلوا جين نشط مقاوم للمضاد الحيوى إلى الخلايا السلفيةprogenitor cells من نخاع العظم البشرى.

ويهتم الباحثون بمعرفة لماذا كانت تعمل الجينات المنقولة بصورة أفضل على نحو متكرر فى الخلايا النامية فى المزرعة عن تلك الجينات المنقولة إلى الحيوانات الحية، وربما تنحصر المشكلة فى وجود اختلاف بيولوجى بين الخلايا الجذعية البدائية والخلايا المستزرعة العادية، وكما ذكر من قبل،فللحصول على تعبير مستديم من جين منقول فى الحيوانات الحية، يجب أن يدخل الجين إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم ويستعيد نشاطه هناك، وقد اكتشف برنشتين وفيليبس وزملاؤهما أن الجينات المنقولة تصبح نشطة عندما تدخل أولاً إلى الخلايا الجذعية،لكنها تتوقف عن نشاطها بعد ذلك، ويقترح البحث الذى قدم من معمل بيتر رجبى فى الكلية الامبريالية للعلوم والتكنولوجيا فى لندن،أن التكرارات الطرفية الطويلة وفيروس مولونى سرطان الدم الفأرى يخمد نشاطها

فى الخلايا الجذعية،وقد يكون ذلك بسبب التعبير الضعيف هناك للجينات المنقولة بواسطة المتجهات المأخوذة من هذا الفيروس، ويتوافق ضعف النشاط هذا مع نتيجة بحث لمجموعة مليجان،فى أن جين الـ ADA موجود بصورة سليمة فى خلايا مخ عظم الفأر،لكنه برغم ذلك غير نشط.

ومن الواضح أن المتجهات الفيروسية تحتاج إلى التعامل معها بطريقة بارعة قبل استخدامها فى تجارب العلاج بالجين البشرى، فلا يستهدف البحث الجديد تحسين تعبير الجينات المنقولة بواسطة المتجهات،ولكنه يستهدف تجاهل مشكلة أمان محتملة، وتسبب بعض الفيروسات الارتجاعية سرطان فى الحيوانات بدخولها فى مجموعة العوامل الوراثية الخلوية بالقرب من أحد الجينات التى لها إمكانية تسرطن، ويصبح المسرطن المحتمل بعد ذلك منشطاً من خلال وجوده تحت سيطرة التكرار الطرفى الطويل الفيروسى،الذى يعتبر محرضاً قوياً على تعبير الجين، ولا أحد يعرف ما إذا كانت المتجهات الفيروسية التى يجرى الاهتمام بها لكى تستخدم فى العلاج بالجين،أنها قد تنشط مسرطناً بطريقة غير مقصودة،عندما تدخل بالقرب منه فى مجموعة العوامل الوراثية،فى حين يصمم الباحثون بما فيهم برنشتين وجيلبوا ومليجان متجهاتهم الجديدة بطريقة ما بحيث تختفى التكرارات الطرفية الطويلة عندما تتكامل جزيئات الـ د.ن.أ الفيروسية، التى يجب أن تقلل احتمالية تنشيط مسرطن.

وبدون التكرارات الطرفية الطويلة الفيروسية،فلن تعبر الجينات المنقولة إلا إذا ارتبطت بتسلسلات منظمة أخرى تعمل على تنشيط نسخ الجين، ويمكن إما أن يترك الجين مرتبطا بتسلسلاته المنظمة ،أو يمكن وصله بواسطة تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم بتسلسلات أخرى محرضة ومحفزة.

وتندمج الجينات المنقولة بالطرق الحالية بطريقة عشوائية داخـل مجموعـة العوامل الوراثية الخلوية، ولا يسـتطيع الباحـث توجيهـا إلـى أى موقـع معين،والفرص التى يدخل فيها الجين إلى موقعه الكرموسـومى الطبيعى،تعـد فرصاً ضئيلة، ولا تزال تأثيرات البيئة الكروموسومية على تنظيم الجين مفتقرة إلى الفهم،لكنه من المتصور أن يكون جين منقول منظماً بصورة أفضل إذا أمكن توجيهه لكى يدخل فى الموقع الصحيح. مثل هذا التطور قـد يحسّـن مسـتقبل العلاج بالجين لأمراض الأنيميا الوراثية،على سبيل المثال،أو أى حالة أخـرى يكون التحكم الدقيق فى نقل الجين مسألة حيوية، وربما تكون أفضـل هـؤلاء جميعاً من وجهة نظر العلاج بالجين، القدرة على إحلال تسلسل جين معيب بدقة بتسلسل سليم مناظر له، وهناك حالة مماثلة تطبق مع الخميرة،لكنها غير قابلـة للتطبيق مع الخلايا الثديية.

وقد أوضح مؤخراً أوليفر سيميثز Oliver Smithies من جامعة ويسكنسين فى ماديسون وراجو كشرلاباتى من جامعة شيكاغو وزملاؤهما، أنه مـن الممكـن توجيه جين جلوبين بيتا البشـرى،بحيث يـدخل فـى موقعـه الكرموسـومى الطبيعى،بالرغم من عدم توصلهم إلى إحلال دقيق لجين جلوبين بيتا البـاطنى النمو بجين جديد، وكان الجين محاطاً من جانبيه بكل من متجـه الـــــ د.ن.أ وبقطع من جين جلوبين بيتا الباطنى النمو. وعلاوة على ذلـك،يعتبر حـدوث الإدخال الموجه قليل جداً، فحوالى خلية واحدة فقط من بين ١٠٠٠ خلية من التى شغلت الــــ د.ن.أ،اندمجت مع جين جلوبين بيتا فـى الموقـع الكرموسـومى الصحيح، وهذا يعنى أن الطريقة ليست فعالة بدرجة كافية لأن تستخدم فى إدخال الجينات إلى الخلايا الجذعية بنخاع العظم للعلاج بالجين، وبرغم ذلك،فقد أوضح

على الأقل سميثيز وكشرلاباتى وزملاؤهما جدوى إدخال الجين،وفتحوا الطريق لتطوير طرق أكثر فاعلية يمكن استخدامها للعلاج بالجين.

نقل الجين إلى سلسلة جرثومية

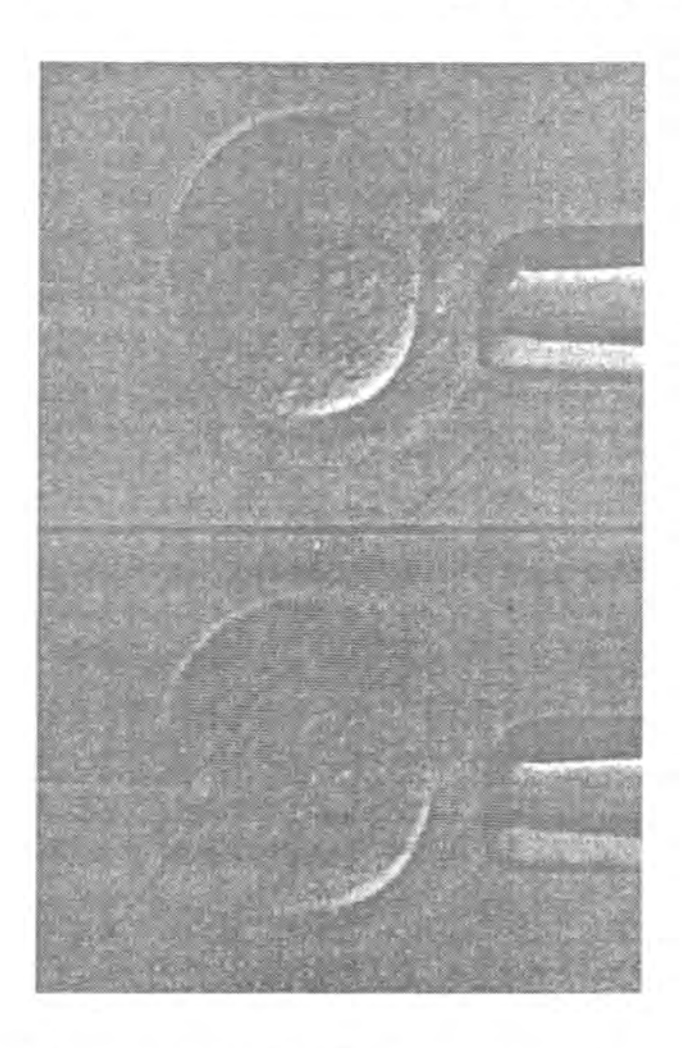
Gene transfer into germ line

طرق نقل الجين التى يجرى تطويرها حالياً لتستخدم فى عـــلاج الأمـــراض الوراثية البشرية، لا تدخل جينات جديدة إلا فى خلايا جسديةsomaic cells،مثل خلايا نخاع العظم، ولن تنتقل هذه الجينات إلى الأجيال القادمة(أى أنها لن تورث إلى الأبناء)، فلا يمكن أن ينتقل جين إلى ذرية شخص إلا إذا كان موجوداً فـــى الخلايا الجرثوميةgerm cells، التى تنتج البويضة والحيوان المنوى.

وعلى مدى السنوات العديدة الماضية،وجد الباحثون أن بإمكانهم إدخال جينات جديدة إلى الخلايا الجرثومية لحيوانات التجارب،التى تشـــمل الفئـــران وذبـــاب الفاكهة، وقد يتم نقل الجينات إلى الفئران عن طريق حقن جين مستنسخ cloned gene بواسطة إبرة رفيعة جداً إلى نوى بويضات مخصبة حديثاً،بينما لا تـــزال فى مرحلة الخلية الواحدة(شكل ١٥-٦)، ويتم الحصول على البويضـــات بعـــد إسقاطها من رحم إناث تزاوجت مؤخرا، وتلك البويضات التى تتحمل إجـــراء الحقن الدقيق نوعا ما،يتم زرعها فى أرحام أمهات بالرضـــاعةfoster mothers، حيث يمكنها أن تنمو بصورة طبيعية حتى موعد الولادة.

وإذا اندمج الجين المحقون فى مجموعة العوامل الوراثية للبويضة المخصبة قبل انقسامها فسوف تحتوى كل خلايا الحيوان النـــاتج(الوليـــد) علـــى الجـــين المنقول،بما فيها الخلايا الجرثومية، إلا أنه أحياناً، لا يحدث الاندماج قبل انقسام

الخلية الأولى للمضغة(قبل أن يصبح جنيناً)،وفى هذه الحالة، فلا يورث الجين لكل خلايا الجسم، وفى جميع الحالات،يندمج الجين المنقول بصورة عشوائية فى مجموعة العوامل الوراثية للفأر.

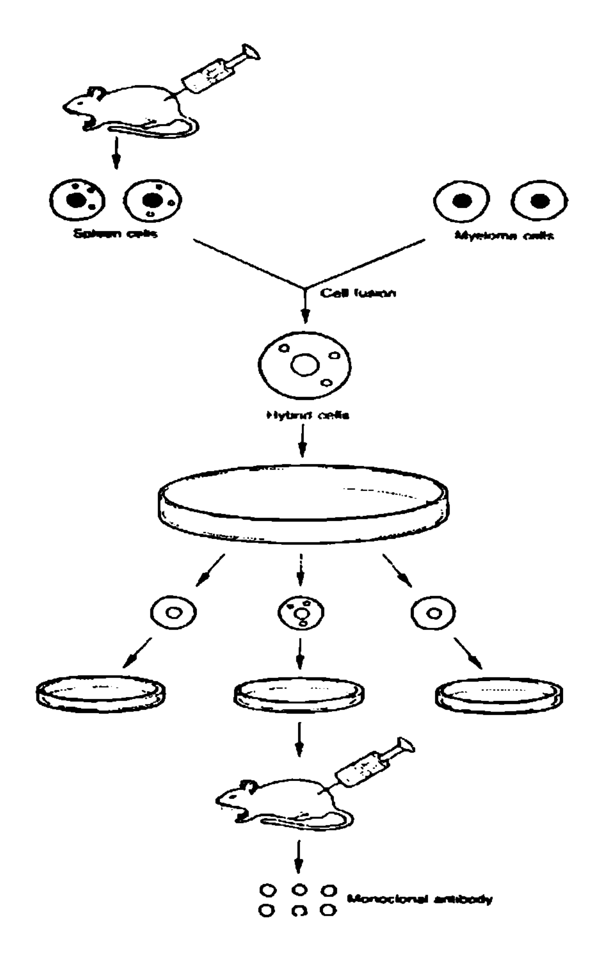


شكل١٥ ــ ٦ حقن بويضة فأر، توضح الصورة العلوية بويضة فأر مخصبة حديثاً،والتى توضع فوق ماصة كبيرة(أنبوب نحيل مدرج لقياس السوائل ونقلها من وعاء لآخر بواسطة المص)، والنواة الأولية الذكرية (وهى نواة الحيوان المنوى قبل اندماجها مع نواة البويضة)يجرى حقنها مع د.ن.أ غريب بواسطة ماصة صغيرة يبلغ قطرها حوالى ١.٥ميكرومتر. وتوضح الصورة السفلى،تورم نواة الحيوان المنوى الأولية بسبب الحقن، ويرى أيضاً،تحت الغطاء الخارجى الصافى تماماً للبويضة بالقرب من الماصة الحاملة،بقية من الحيوان المنوى المُخصب.

وبواسطة أيادى أكثر مهارة ،فإن حوالى من ٥إلى ١٠% من بويضات الفأر المحقونة تعيش وتنمو إلى أجلها الطبيعى،فحوالى ٣٠% من الحيوانات التى تولد تحمل الجين الغريب،ويمكنها أن تنقله إلى ذريتها، ومن الباحثين الذين كان لهم قصب السبق فى طرق حقن بويضة الفأر،رالف برنستر Ralph Brinster من مدرسة طب البيطرى بجامعة بنسيلفانيا وريتشارد بالمتر Richard Palmister من جامعة واشنطن فى سيتل، وفرانك قسطنطيني Frank Costantini من كلية الأطباء والجراحين بجامعة كولومبيا فى مدينة نيويورك وإليزابيث لاسي Elizabeth Lacy من معهد سرطان سلوان-كيترينج التذكارى وأيضاً من مدينة نيويورك، وبيتريس منتز Beatrice Mintz من مركز سرطان فوكس شيز فى فيلاديفيا، وفرانك ردل Frank Ruddle من جامعة يل فى نيوهافن بولاية كونكتيكت.

ولم تأت التجارب الأولى للجينات المنقولة خاصة بأية منتجات فعالة من الفئران التى نقلت إليها الجينات، ويرجع السبب الغالب لهذا الفشل إلى الترتيبات المعادة والتمزق المتلاحق للجينات،فى حين أسهم التحكم الخاطئ أيضاً فى مشاكل التعبير، ففى عام ١٩٨٢،وجد برنستر وبالمتر وزملاؤهما،إن بإمكانهم الحصول على تعبير جيد من الجينات المنقولة،عن طريق ربطها بتسلسل منظم،يعتبر محرضاً قوياً للنسخ. وقاموا بإنشاء جينات مهجنة،تم فيها ربط التسلسلات المشفرة عن تركيب البروتين بمحرض جين الميتالوثيونين metallothionein، ويعتبر ميتالوثيونين بروتين يمكنه الارتباط بمعادن سامة مثل الكادميوم والزنك،و من ثم يزيلها من الدورة الدموية، ويحتفظ محرض الميتالوثيونين عادة بالجين فى حالة نشاط، لكنه يستجيب أيضاً للتركيزات العالية للمعادن من خلال زيادة نسخه.

وأوضحت مجموعة برنستر-بالمتر Brinster-Palmiter في البداية، أن هنـــاك جين مهجن يحتوى على محرض الميتالوثيونين بالإضافة إلى جـــين فيروســـى لإنزيم ثيميدين كيناز thymidine kinase، يعبر فى الفئران، وكان التعبير جيـــداً على وجه الخصوص،عندما أعطت الحيوانات جرعات شبه قاتلة من الكادميوم أو الزنك،وهما المعدنان اللذان يزيدان بصورة طبيعية تعبير جين الميتالوثينين، وفى تجارب لاحقة قاموا بتثبيت محرض الميتالوثيونين بجـــين إمـــا للفـــأر أو لهرمون النمو البشرى ، ولم تحمل فقط بعض الفئـــران التـــى تطـــورت مـــن البويضات المحقونة بواسطة الجينـــات المهجنـــة الـــــــــ د.ن.أ الغريـــب فـــى خلاياها،لكنها أيضاً صنعت هرمون النمو المماثل،وكبرت بصورة أســـرع مـــن صغار الحيوان littermates،التى لم تكتسب الجين الغريب(شكل ١٥-٧).



شكل ١٥ ــ ٧ "الفأر الضخم" ،الفأران أخوان من نفس البطن،ويبلغ عمرهما ٢٤ أسبوعا، والحيوان الموجود فى يمين الصورة،الذى يزن ضعف أخيه الطبيعى يحتوى على جين جديد مهجن،يتكون من تسلسلات منظمة من جين الميتالوثيونين،التى تم ربطها بالتسلسلات المشفرة عن البروتين فى جين هرمون النمو البشرى، وقد تم إدخال الجين بواسطة حقن البويضة،واندمج مع د.ن.أ الفأر الذى نما، وانتقل الجين الغريب إلى ذرية الحيوان،وتلك الحيوانات التى اكتسبت هذا الجين كبرت أيضا وأصبحت ضعف وزنها الطبيعى. ويمثل القضيب المنحنى تركيب الجين المنقول، ويمثل اللون الأصفر تسلسل الميتالوثيونين.ويمثل اللون الأحمر تسلسل هرمون النمو البشرى، والمنطقة المحددة بالعلامةpBR،هى من متجه استخدم فى الأساس لاستنساخ الجين المهجن.

وكانت الجينات المهجنة فى الفئران المسيطر عليها أكثر شبها بجين الميتالوثيونين عن جين هرمون النمو، وعادة لا يصنع هرمون النمو إلا فى الغدة النخاميةpitutary gland فى قاعدة المخ،لكنه فى هذه الحيوانات كان يخلق أساساً

فى الكبد والكليتين،وهما المركزان اللذان ينتج بهما الميتالوثيونين عادة ، وعلاوة على ذلك،كان يحفز الكادميوم والزنك على تعبير الجينات المهجنة، ومنذ هذه التجارب الأولى،أوضح العديد من الباحثين أن الجينات المدخلة فى الفئران بواسطة حقن البويضة يمكن التحكم فيها بطريقة عادية. وجاء نموذج حديث من هوارد جودمانHoward Goodman وزملائى فى المستشفى العام بماساشوستس ومدرسة هارفارد الطبية فى بوسطن، فالأنسولين يجب ألا يخلق إلا فى خلايا بيتا فى البنكرياس،ويجب أن يحفز الإنتاج بواسطة تركيزات متزايدة من سكر جلوكوز الدم، وقد وجدت مجموعة جودمان أن تعبير جين الأنسولين البشرى فى الفئران قد اتبع هذا النمط الطبيعى.ويمكن إدخال الجينات أيضاً فى سلاسل من ذباب الفاكهة بطرق حقن البويضة،والتى قام بتطويرها جيرالد روبين Gerald Rubin والين سبرادلنجAllen Spradling من قسم الأجنة بمؤسسة كارنيجى بواشنطن والتى تقع فى بالتيمور بولاية مريلاند، واكتشف روبين وسبرادلنج أن "العناصر الانتقالية"Transposable elements،تصنع متجهات مناسبة تماماً لطرق نقل الجين، وقبل ذلك،لم ينجح نقل الجين إلى ذباب الفاكهة.

والعناصر الانتقالية،هى قطع موجودة بصورة طبيعية فى الـ د.ن.أ، يمكنها القفز حول مجموعة العوامل الوراثية لنوع العائل،وتهبط أحياناً فى الجينات، ونتيجة لذلك تسبب الطفرات، ويعتقد بأن هذه العناصر موجودة فى كل الأنواع،لكنه لم تعزل حتى الآن إلا من البكتيريا والخميرة والذرة وذبابة الفاكهة، وفى عام ١٩٨٢،عزل روبرت وسبرادلنج عنصراً انتقالياً من نوع خاص من ذبابة الفاكهة، يسمى بعنصرP. وقد أوضحا أن الجينات التى اندمجت مع العنصرP،وحقنت فى أجنة ذبابة فاكهة صغيرة،تنتقل بكفاءة عالية جداً–٥٠% أو

أكثر- إلى السلاسل الجرثومية للحشرات الناتجة، فى حين تهرب هذه الجينات المنقولة من تغيير الأوضاع ، وغالباً ما تشاهد فى الجينات التى نقلت إلى الفئران بواسطة حقن البويضة،بدون الاستفادة من عنصر P.

وكان لكفاءة الاندماج العالية وقلة تغيير أوضاع الجينات التى يقوم بها عنصر P،أن جعلت العديد من الباحثين يحاولون استخدامه كمتجه لنقل الجين إلى الخلايا الثديية، ولم يكتب لهم النجاح حتى الآن، ومع ذلك، فإن روبين الذى يعمل حالياً بجامعة كاليفورنيا وزميلاه فى بركيلى ،فرانك لاسكى ودونالد ريو،ربما يكونوا قد اكتشفوا السبب فى عدم فعالية العنصر P،لاستخدامه كمتجه فى الخلايا الثديية. وتتطلب حركة العنصر فى مجموعة العوامل الوراثية نشاط إنزيم يسمى ترانسبوساز، الذى يشفر عنه العنصر P نفسه وفى ذبابة الفاكهة، لا ينشط الترنسبوساز إلا فى الخلايا الجرثومية، وقد كشف البحث الذى قام به حالياً باحثو باركلى السبب فى خمود الإنزيم فى الخلايا الجسدية، حيث تفتقر الخلايا إلى القدرة على إزالة واحد من التسلسلات الثلاثة المعترضة التى تقسم جين تراسبوساز إلى أربع قطع، وكنتيجة لذلك، لا تستطيع الخلايا الجسدية أن تصنع ر.ن.أ رسول نشط للإنزيم. ومضى روبين وزملاؤه يوضحون أنه إذا أزالوا التسلسل المعترض من جين ترانسبوساز، فإن العنصر P سيعمل فى الخلايا الجسدية لذبابة الفاكهة بالإضافة إلى الخلايا الجرثومية، ومن الممكن استخدام نفس الاستراتيجية فى استخدام العنصر P كمتجه للخلايا الثديية.

على الرغم من أن الباحثين قد طوروا طرق حقن البويضة أساساً،لدراسة الكيفية التى تنشط وتخمد بها الجينات أثناء التطور الجنينى،إلا أنه يمكن استخدام

هذا النظام أيضا فى إنتاج سلالات جديدة مـــن الحيوانـــات الأليفـــة domestic animals.فإذا أمكن إدخال نسخ إضافية من جين هرمون النمو فى الأبقار علـــى سبيل المثال،فقد تنمو الحيوانات بصورة أسرع،كما هو الحال فى الفئران،وربما تنتج مزيداً من الألبان، فالباحث برنستر من بين باحثين آخرين، حاول تجريـــب حقن بويضات الحيوانات الأليفة،التى تشمل الخنازير والأغنام والأبقار،بواسطة جين هرمون النمو، ويعتبر حقن بويضات هذه الحيوانات أكثر صعوبة من حقن بويضات الفئران،لأن بويضات الحيوانات الأليفة أكثر عتامة مما يجعـــل مـــن الصعب رؤية النواة، وتوضح النتائج الأولية إن النسبة الصغيرة مـــن الأغنـــام والخنازير التى تطورت من البويضات المحقونة بواسطة جين هرمـــون النمـــو البشرى قد حملت الجين الغريب،فى حين لم تنمو الحيوانات بطريقة أسرع مـــن معدل النمو المعتاد.

وفيما يمكن تصوره ،فإنه يمكن استخدام طرق حقن البويضة لإدخال جينات جديدة إلى الأجنة البشرية، ويمكن الحصول على البويضات المخصبة بطـــرق الإخصاب فى المعمل (أطفال الأنابيب)التى تم تطويرها،لمساعدة الأزواج الذين لا يستطيعون الإنجاب بطريقة طبيعية، وبالرغم من ذلك،فلم يجرى التفكير فـــى هذه التجارب بصورة جدية بسبب المشاكل العملية والأخلاقية التى تنجم عنهـــا، السبب الأول،كان لحقن البويضة نسبة فشل عالية، ووفقاً لبرنستر،الذى قد يكون له خبرة أكبر فى هذه التجارب عن أى باحث آخر،إن حوالى ١٠% تقريباً مـــن الأجنة المحقونة أنتجت بالفعل ذرية حية،ولا يزيد على أكثر مـــن ثلـــث هـــذه الحالات-فى أفضل الأحوال-يحمل الجين المحقون.

السبب الثانى،لا يوجد حالياً طريقة للتحكم فى المكان الذى سيندمج فيه الجين الجديد داخل مجموعة العوامل الوراثية للخلايا المستقبلة للجين، وقد يؤدى الأمر إلى تأثيرات خطيرة إذا مزق الجين الجديد جينا أساسياً. ويبرهن كلا من منتــز وبرنستر على اقتراح بأن هذا يمكن أن يحدث، لكن المثال الأوضح قد جاء من معمل فيليب ليدر فى مدرسة هارفارد الطبية، فيبدو أنه وزملائى قــد أعــادوا تخليق عيب معروف فى أحد الأطراف النامية فى الفئران،فى إحدى تجــاربهم لحقن البويضة.

لا يشكل هذا النوع من الطفر المقحم مشكلة إذا حدث أثناء نقل الجــين إلــى خلايا نخاع العظم، ففى هذا النوع من النقل،تمتص العديد من الخلايــا الجــين الجديد وتدمجه بطريقة عشوائية فى الأماكن الكرموسومية، وإذا حدث أن مزق الجين المدخل(الجديد) جينا فى بعض الخلايا،فربما تختفى هــذه الخلايــا أو لا تعمل بالصورة الصحيحة،فى حين لا يكون التأثير على المريض ملحوظاً، وإن احتمال حدوث تشوه متطور فى أحــد أطــراف شــخص مــا بســبب حقــن البويضة،يعتبر حالة مختلفة تماماً.

وعلاوة على ذلك،فقد أوضح ليدر وبرنستر،أن فى إمكانهما تخليــق فئــران "لديها قابلية لتكون الورم"،عن طريق حقن الجينات فى البويضــات المخصــبة، وفى كلتا الحالتين ،استخدما جينات لها إمكانية تسرطن معروفة ،فى حــين أن الــــ د.ن.أ الغريب يمكن أن يكون مسرطناً،حتى لو لم يكــن يحتــوى علــى مسرطن معروف، وكما ذكرنا من قبل،يمكن أن تســبب التكــرارات الطرفيــة الطويلة الفيروسية بعض السرطانات فى الحيوانات، عند إدخالها بــالقرب مــن مجموعة العوامل الوراثية الخلوية وتنشيطها لمولدات سرطان محتملة، ويعمــل

الباحثون حالياً على تقليل إمكانية هذا الحدوث،أثناء نقل الجــين إلــى الخلايــا الجسدية،ولكن حتى إذا ثبت أن السرطان نتيجة نادرة للعــلاج بالجين،فقــد لا يكون من الضروري منع استخدامه في الأمراض الوراثية،التي كانت لها بالفعل وفاة مبكرة كنتيجة مؤكدة، والعديد من العقاقير المستخدمة لعلاج السرطان هــي نفسها مسرطنة، غير أن الخطر يعتبر مقبولاً إذا كانت لها فرصة إنقاذ المرضى من مرض مهدد للحياة حالياً.

ويجب أن يطبق نفس المبدأ أيضاً على استخدام العلاج بالجين، فــي عــلاج الأمراض الوراثية المهلكة،بمجرد أن يتمكن الباحثون من التغلب على المشــاكل التي يواجهونها في الحصول على تعبيرات مناسبة من الجينات المنقولة، وفــي تلك الأثناء،تبرهن أساليب نقل الجين على فاعليتها كأدوات مفيدة لدراسة كيفيــة التحكم في تعبير الجين أثناء النمو،وربما تثبت فعاليتها أيضاً في تطوير سلالات جديدة من الحيوانات الأليفة.

الفصل السادس عشر

التكنولوجيا الحيوية والتنافس الدولى والاستراتيجيات التنظيمية

Biotechnology, international competition and regulatory strategies

تواصل ثورة التكنولوجيا الحيوية انتشارها بسرعة فى كافة أنحاء العالم،و من الدول التى لها الريادة فى هذا الحقل حالياً : الولايات المتحدة، واليابان، ودول غرب أوروبا، وسوف يعتمد نجاح كل دولة فى تنافسها على تطوير وتسويق منتجات صناعاتها من التكنولوجيا الحيوية على عدة عوامل، وتشمل هذه العوامل، توفر رأس المال الخاص المستثمر، وقوة وضعف المؤسسات البحثية الأكاديمية، ودرجة التعاون بين الصناعة والبحث الأكاديمى وإسهامات الحكومة.

ويمكن أن تشمل الإسهامات الحكومية على كل من تقديم الدعم المباشر للبحث التكنولوجى الحيوى،وعلى تهيئة المناخ الذى يمكن تنمو فيه صناعات التكنولوجيا الحيوية وتنجح أو لا تنجح حسب الأحوال، وسيعتمد جزء كبير من هذا المناخ على سياسات الحكومة لتنظيم تطوير منتجات التكنولوجيا الحيوية، ويجب أن تحافظ الاستراتيجية التنظيمية المثالية على أمان البشرية والبيئة،دون إعاقة غير مناسبة لتطوير المنتجات الجديدة.

استراتيجيات دولية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية

International strategies for fostering biotechnology

التكنولوجيا الحيوية فى اليابان

Biotechnology in Japan

يعد الالتزام المباشر للحكومة بالتكنولوجيا الحيوية،سمة تميز الجهد اليابانى لتشجيع الأهداف الناجحة لجهود تطوير التكنولوجيا فى تلك الدولة، ويتولى مسؤولية تنفيذ البرامج الحكومية فى اليابان : وكالة العلوم والتكنولوجيا Science and Technology Agency، ووزارة الصناعة التجارة الخارجية Ministry of International Trade and Industry، ووزارة الزراعة والغابات والمصايد Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.

وتشجع سياسات الحكومة اليابانية على التعاون بين الشركات الصناعية،التى تشمل مشروعات مشتركة بين اثنين أو أكثر من المؤسسات اليابانية وبين الشركات والبحث العلمى ، وقد جعلت الحكومة اليابانية من التكنولوجيا الحيوية هدفاً للتطوير، وقد خصص العمل من خلال مؤسسات يابانية كبيرة ومعترف بها، مصادر كبيرة من رؤوس الأموال من أجل تطبيقاتها التجارية.

وقد اختارت وزارة الصناعة التجارة الخارجية ثلاث مجالات كبرى من التكنولوجيا الحيوية لبرنامج تطوير وأبحاث مدته عشر سنوات، وسوف يركز البرنامج على تحسين أساليب استزراع كتلة الخلية،وتكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، وتطوير المفاعل الحيوى، وتعد المفاعلات الحيوية الفعالة،وهى الأوعية التى تصنع فيها منتجات التكنولوجيا الحيوية بواسطة كائنات مجهرية أو خلايا

أخرى وسيلة أساسية للانتقال الناجح من المعمل إلى الإنتـــاج التجـــارى لهـــذه المنتجات.

بالإضافة إلى ذلك،فقد أنشأت اليابان مؤسسة لأبحاث التكنولوجيـــا الحيويـــة والتنمية، تتكون من ١٤ شركة دوائية وكيميائيـــة، وأعلنـــت وزارة الزراعـــة والغابات والمصايد أيضاً عن إقامة مركز تكنولوجيا حيوية لتشجيع البحث فـــى مجال التكنولوجيا الحيوية، ويعتبر العديد من هذه المبـــادرات التشـــجيعية،ثمار المجلس اليابـــانى للعلـــوم والتكنولوجيـــا Japanese Council for Science and Technologyالذى تولى رئاسته بنفسه رئيس الوزراء ناكاسونى ، وقـــد أعلـــن المجلس أن الحكومة اليابانية تضع التكنولوجيا الحيوية على قمة أولوياتها .

وبمقارنة الموقف فى الولايات المتحدة ، الذى يوجه معظم التمويل الحكومى إلى الأبحاث الأساسية،فإن التمويل الحكومى فى اليابان يوجه بصفة أساسية إلى البحث التطبيقى،ويركز بشكل أكبر على مشروعات معينة، ونتيجة لـــذلك،يتوفر لدى الولايات المتحدة عدد كبير من العلماء للقيام بالأبحاث الأساسية،لكنها تفتقر إلى مهندسى التشغيل الحيوى وبرنامج تدريبهم، ويستهدف عمل هندسة التشغيل الحيوى حل المشاكل المتعلقة برفع نسبscaling-up مقادير صغيرة من المـــواد التى تصنع من خلال العمليات المعملية إلى مقادير كبيرة جداً، تنـــتج بمقـــادير تجارية حتى تكون مجدية اقتصادياً.

ومشكلة اليابان هى عكس مشكلة الولايات المتحدة، فلدى اليابان عدد كبيـــر من مهندسى التشغيل الحيوى،فى حين تفتقر إلى الأعداد الكافيـــة مـــن العلمـــاء المدربين فى مجال الوراثة الجزيئيةmolecular gengtics، ونتيجـــة لـــذلك،تعتبر

اليابان فى الوقت الراهن ، الدولة الرائدة فى العالم فى تكنولوجيا التخمير والتصنيع الميكروبى لسلع كيميائية مثل،الأحماض الأمينية،وهو المجال الذى قد تسهم فيه التكنولوجيا الحيوية من أجل تخفيض تكاليفه، ولكن فى مجالات مثل استزراع الخلية الثديية mammalian cell culture وهندسة البروتين protein engineering،فإن اليابان تعتبر فى المرتبة الثانية بعد الولايات المتحدة،ويجب أن تزيد دعمها فى مجال التدريب والأبحاث والتنمية،إذا ما رغبت فى التنافس.

أساليب عمل أوروبية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية

European approaches to fostering biotechnology

إحدى نتائج ثورة التكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة،إنشاء العديد من الشركات الصغيرة،التى تهدف بشكل محدد إلى استغلال أحدث التطورات فى أبحاث الوراثة الجزيئية والجسم المضاد أحادى الاستنساخ، ووفقاً لدراسة أجرتها أخبار الهندسة الوراثية فى عام ١٩٨٤،وجدت أن لدى حوالى ثلاثمائة شركة أمريكية معظمها من الشركات الجديدة والصغيرة، برامج تكنولوجيا حيوية كبيرة، وعلى عكس الولايات المتحدة،تعانى أوروبا من نقص رأس المال المستثمر واللازم لإقامة هذه العمليات، ونتيجة لذلك،يأتى التمويل الأساسى للمعامل الأوروبية للقيام بأبحاث التكنولوجيا الحيوية من المؤسسات الصناعية التقليدية والمؤسسات التمويلية والحكومات العديدة.

ويمكن للشركات الأوروبية الكبرى،التى تعمل بنظام الشركات متعددة الجنسيات ولها مصادر تمويلية كبيرة أن تنسق جهودها مع المجموعات الأخرى فى العالم، وعلى سبيل المثال، قدمت شركة هوكست للأدوية والمواد الكيميائية

فى ألمانيا منحة لجامعة هارفارد والمستشفى العام بماساشوستس فـــى بوســطن بأمريكا بمبلغ مائة مليون دولار للقيام بالأبحاث الأساسية فى مجال البيولوجيـا الجزيئية، وقامت بتدريب العلماء فــى شــركتها، ولشــركة هوكسـت أيضـاً مشروعات تعاونية مع كل من الشركات الأمريكية والبريطانية واليابانية.

وتقوم الحكومات الأوربية بتطوير استراتيجياتها الخاصة لتشجيع المشروعات الناجحة فى التكنولوجيا الحيوية، وتشمل هذه الاستراتيجيات بصفة أساسية،تقديم الدعم إلى شركات التكنولوجيا الحيوية الجديـدة، والمشــروعات الكبــرى ذات الأساس التعاونى ،وإلى البرامج الأكاديمية فــى التكنولوجيـا الحيويــة، وإلـــى التعاونيات الصناعية العديدة، وتهدف المشــروعات التــى تكفلهـا الحكومـات الأوربية،مثل المشروعات القائمة فى اليابان إلى التركيز على الأبحاث التطبيقية بدلاً من الأبحاث الأساسية.

ويأتى مصدر التمويل العام للتكنولوجيا الحيوية فى المملكة المتحدة من عـدة مصادر مختلفة،تضم من بينها هيئة التجارة والصــناعة Department of Trade and Industry ، ومجلس أبحاث العلوم والهندســة Science and Engineering Research Council ، ومجلس الأبحــاث الطبيــةMedical Research Council. وتعتبر مجموعة التكنولوجيا البريطانية، من المؤسسات العامة التى أنشأت مــن أجل المساعدة على نقل الأبحاث الأساسية فى التكنولوجيا الحيوية إلى الاستغلال التجارى، ومن بين مشروعاتها الأخرى، مساعدتها على دعم تكنولوجيا الخليــة Celltech،وهى مؤسسة صغيرة متخصصة فى مجال تكنولوجيا الجسم المضــاد أحادى الاستنساخ.

وفى ألمانيا،تدعم الوزارة الفيدرالية للأبحاث والتكنولوجيا تطوير التكنولوجيا الحيوية الأساسية،وتشجع على نقل التكنولوجيا الحيوية إلى مجـــال الصـــناعة، وتقدم الوزارة أيضاً منح للمعامل الحكومية والجامعات والمعاهد،والتى من بينها معهد مـــاكس بلانـــكMax Planck Institute. وجمعيـــة البحـــث التكنولـــوجى الحيويThe Society for Biotechnological Research،وهو معمل حكومى يعد من أفضل المراكز البحثية فى التكنولوجيا الحيوية فى أوروبـــا،يعتبر مؤسســـة أخرى تهتم بنقل التكنولوجيا الحيوية إلى التطبيق التجارى.

ويقدم التمويل الحكومى الفرنسى لمجال التكنولوجيا الحيوية من خلال وزارة الأبحاث والصناعة،ومعاهد حكومية مثل، معهد أبحاث الصناعة، بالإضافة إلى ذلك،يقوم المركز القومى للأبحاث العلمية ومعهد الصحة والأبحاث الطبية بإنشاء برامج فى البيولوجيا الجزيئية، قد تؤتى بثمارها فى صناعة التكنولوجيا الحيوية.

وتولى الحكومة الفرنسية اهتماماً كبيراً للتكنولوجيـــا الحيويـــة،إذ تســـتهدف الإسهام بحصة ١٠% من السوق العالمى للتكنولوجيا الحيويـــة بحلـــول عـــام ١٩٩٠، ومع ذلك،فقد تأتى فرنسا بعد الولايات المتحدة واليابان وبعض الـــدول الأوربية الأخرى فى التطور التجارى الشامل للتكنولوجيا الحيوية.

وأنشأت هولندا مؤخراً سلسلة من"البرامج الجديدة الموجهة للأبحـــاث" التـــى تدعمها وزارتان هما:وزارة الشـــئون الاقتصـــادية ووزارة التعلـــيم والعلـــوم، ويخصص أحد هذه البرامج للتكنولوجيا الحيوية ،حيث يركـــز علـــى الأبحـــاث الأساسية والتطبيقية فى الجامعات والمعاهد البحثية التى لا تســـعى للـــربح-non profit-making research institutes،وتقوم بتوجيهـــه وتمويلـــه وزارة الشـــئون الاقتصادية، ولبرنامج التكنولوجيا الحيوية أربعة أقسام فرعية،ويهتم كل واحـــد

منها بالتصنيع والرعاية الصحية والزراعة والبيئة.وتتسم أبحاث التكنولوجيا الحيوية فى الجامعات الهولندية بأسلوب انضباطى متعدد على المشروعات التطبيقية،مع إشراك بعض الجامعات فى برامج مشتركة، وتدعم الأبحاث بمنح حكومية وعقود فردية من الحكومة والصناعة، وقد أقامت الجامعات بالفعل العديد من المشروعات التجارية الصغيرة لتسويق منتجات أبحاثها. وللجامعات أيضاً خطط لتقديم برامج تعليمية جديدة فى مجال التكنولوجيا الحيوية، وتتركز أنشطة التكنولوجيا الحيوية الصناعية فى شركات كبيرة متعددة الجنسية،تهتم بصفة عامة بتطبيقات البحث العلمى على خطوط الإنتاج.

ولا توجد لدى سويسرا،التى لديها أعلى دخل للفرد من بين الدول الصناعية سياسة حكومية لتشجيع التكنولوجيا الحيوية، فالعلوم السويسرية ليست مركزية بدرجة كبيرة،حيث تتم معظم الأبحاث والتنمية فى الصناعة، والشركات السويسرية،بالإضافة إلى وجود برامجها التعاونية،فإنها تدعم البحث الأساسى فى المعاهد الخاصة، وتشجع الجامعات على التركيز على الأبحاث الأساسية والتعليم. وتدعم الحكومة السويسرية معهدين فيدراليين للأبحاث،أحدهما فى زيورخ والآخر فى لوزان،فى حين يوجه معظم تمويل الأبحاث إلى جامعات الولايات ،التى تتلقى أيضا تمويلاً بحثياً كبيراً من حكومات المقاطعات .

وبالإضافة إلى المبادرات التشجيعية الفردية،تعمل الدول الأوربية مجتمعة بعدد من الطرق لكى تنافس بصورة أكثر فاعلية الولايات المتحدة واليابان، ففى عام ١٩٨٢،بدأت مفوضية الجماعة الأوروبية Commission of the European Communitiesبرنامج هندسة حيوية جزيئية لمدة خمس سنوات الذى أنفق حوالى خمسة عشر مليونا من الدولارات على مائة عقد لمشروعات بحثية متخصصة ،

ومن المفوضيات الأخرى المعنية،مفوضية مشروع معلومات التكنولوجيا الحيوية الأوربى،الذى يسهل تبادل المعلومات التكنولوجيا الحيوية فى أوروبا.

وتشمل المنظمات التعاونية الأخرى المهتمة بالتكنولوجيا الحيوية، الاتحاد الفيدرالى الأوروبى للتكنولوجيا الحيوية European Federation of Biotechnology،الذى يعقد المؤتمرات والآليات الأخرى،التى تعمل على إنجاح أنشطة النظم الانضباطية المتبادلة فى مجال التكنولوجيا الحيوية،ومنظمة البيولوجيا الجزيئية الأوروبية،التى تشجع البحث الأساسى ونقل المعلومات فى مجال البيولوجيا الجزيئية.

وقد اتخذت المجموعة الاقتصادية الأوربيةECC خطوات لحفز كل من البحث الأساسى والتطبيقى فى تكنولوجيات عديدة، ويشير آخر تقارير المجموعة الاقتصادية الأوربية،إلى أن التطبيقات العملية فى مجال التكنولوجيا الحيوية تتأخر حالياً ،نتيجة قصور النظر فى الفسيولوجيا الميكروبية،وتحدد مجالات بحثية سيعتمد عليها التقدم فى المستقبل، وتشمل هذه المجالات فسيولوجيا الكائنات العضوية من بيئات غير عادية،وتعديل البروتينات، وتنظيم دورة الخلية، والكائنات المجهرية المجمدة لإنتاج بروتينات مهندسة وراثياً، ويخرج التقرير بنتيجة أن هناك نقص على المستوى العالمى فى أعداد المختصين المؤهلين بدرجة كبيرة للاطلاع بهذه المهام،والذى ستكون نتيجته خلق عراقيل أمام التجديد فى مجال التكنولوجيا الحيوية،خصوصا فى أمريكا الشمالية وبدرجة أقل فى أوروبا واليابان.

وعلى الرغم من الجهود التعاونية للمجموعة الاقتصادية الأوربية ومفوضية المجموعة الأوربية،فيجب على أوروبا القيام بالكثير لمسايرة التقدم مع اليابان والولايات المتحدة فى التطوير والتطبيق الصناعى للتكنولوجيا الحيوية، وعلى سبيل المثال،يجب إعادة تنظيم الإدارة الأوروبية والعمل والحكومات للإعداد لتطورات تكنولوجية حيوية جديدة.

وهناك جهد مكثف يجب أن يبذل أيضا للتغلب على بعض المشاكل الأخرى التى قد تعوق التطور التكنولوجى الحيوى فى أوروبا، وتشمل هذه المشاكل تنحية الشركات الأوربية من المنافسة، ومعدلات الضرائب الهامشية العالية،التى تحد من استثمار رؤوس الأموال،والقوانين المتشددة، والتنظيم الزائد عن الحد ، ومع ذلك،وكما ذكر مارك دبنرMark Dibner،فى استعراض للجهود الأوربية فى مجال التكنولوجيا الحيوية،أنه يجب على أوروبا ألا تخطى التقدير، فإذا نجحت جهود المجموعة الاقتصادية الأوروبية والجهود القومية فى التنسيق والدعم،فسوف يكون للصناعات الأوروبية تواجد نشط فى أسواق التكنولوجيا الحيوية العالمية.

استراتيجيات الولايات المتحدة من أجل أبحاث وتطوير التكنولوجيا الحيوية

US strategies for biotechnology research and development

كيف يمكن للولايات المتحدة،التى احتلت لفترة طويلة موقعاً ريادياً فى مجال أبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية، الاستمرار فى إحراز الابتكارات التكنولوجية

المطلوبة لنمو وتطور اقتصادى قوى؟ ناقشت العديد من الدراسات المتكاملة هـ الموضوع بشكل محدد فى الآونة الأخيرة، وأكدت التقارير على أهمية الاستثمـ الحكومى فى الأبحاث الأساسية،وطالبت أيضاً باهتمام متزايـد مـن الحكومـ والبحث العلمى والصناعة،لإيجاد أفضل الوسائل للتشجيع على نقل التكنولوجيـ. وقدمت التوصيات التى تضمنتها التقارير،استراتيجية لتشجيع التطور الصـناعى للتكنولوجيا الحيوية ومواجهة تحديات التنافس الدولى.

لجنة الرئيس للتنافس الصناعى

President's Commission on Industrial Competitiveness

فى يونيه عام ١٩٨٣،أنشأت لجنة الرئيس للتنافس الصناعى،التى تتشكل فى أغلبها من كبار الموظفين التنفيذيين لشركات التكنولوجيا العالية، لتقديم المشورة للصناعة الأمريكية والحكومة عن السياسات الحكومية بشأن التنـافس الـدولى. وبعد إنشاء اللجنة بثمانية عشر شهراً،أعلنت عن تقرير منافسة عالمى"الحقيقـة الجديدةThe New Reality"،الذى يوصى بزيادة الـدعم الحكـومى للأبحـاث الجامعية،والأبحاث المتعلقة بتكنولوجيات التصنيع الابتكارى، وأوصى التقريـر أيضاً بصفة خاصة بائتمان ضريبى جديد حتى تشجع الصـناعة علـى القيـام بالمزيد من الاستثمار فى الأبحاث الجامعية.

وتبعاً للبيانات التى جمعتها وأعدتها مؤسسة العلوم القومية(NSF)،فقـد بلـغ إنفاق الولايات المتحدة على الأبحاث والتنمية(R&D) مائة واثنـين وعشـرين مليارا من الدولارات فى عام ١٩٨٦،بلغ ما قدمته منه الحكومة الفيدرالية حوالى ثلاثة وخمسين مليارا من الدولارات ، وعلى مدى الخمس سنوات الماضية،كانت

تتركز الزيادات فى الدعم الحكومى للأبحاث والتنمية فى مجالات الأبحاث الأساسية والحماية ، وتلقت حماية الأبحاث والتنمية فى عام ١٩٨٦ مبلغ سبعة وثلاثين بليوناً من الدولارات –وهى تمثل ٧٠% من أجمالى النفقات الفيدرالية على الأبحاث والتنمية – وتلقت أبحاث الصحة خمسة ونصف بليون من الدولارات.

ووجدت اللجنة الرئاسية أن الدعم الفيدرالى للأبحاث والتنمية فى القطاع المدنى مشتتاً بدرجة كبيرة ويفتقر إلى التنسيق الملائم ، وللتغلب على هذه المشاكل،اقترح تقرير اللجنة أن تنضم جميع وكالات الأبحاث والتنمية المدنية فى دائرة علوم وتكنولوجيا ذات مستوى وزارى واحد، إلا أن هذا الاقتراح لا يحتمل الأخذ به،لأنه قد يتطلب إعادة تنظيم كبير للبرامج الفيدرالية للأبحاث والتنمية وسوف يتطلب إجراء دستورى لتغيير الهيئات الدستورية المرتبطة بها، وامتدح التقرير أيضاً المبادرات التشجيعية للولايات والأقاليم لتشجيعها على التعاون بين الحكومة والجامعات والصناعة،عن طريق برامج التنمية الاقتصادية والمالية.

مكتب الميزانية التابع للكونجرس

Congressional Budget Office

فى يونية عام ١٩٨٥،أصدر مكتب الميزانية التابع للكونجرس(CBO) تقريراً بعنوان "الدعم المالى الفيدرالى لصناعات التكنولوجيا المتقدمة"، وقد نبع هذا التقرير من اهتمام الكونجرس بالتحدى الدولى المتزايد للتكنولوجيا الأمريكية،والذى تدعم معظمه الحكومات الأجنبية، وذكر التقرير أن الكونجرس

حاول التقليل من تكاليف الأبحاث والتنمية الخاصة،عن طريق توحيد سياسة ضريبية ، وإنفاق مباشر وتشريع براءات الاختراع.

ويقدم تقرير مكتب الميزانية التابع للكونجرس مثل تقرير اللجنة الرئاسية خيارات للائتمان الضريبى، لحفز الصناعة على القيام بأبحاث التكنولوجية المتقدمة، ومجموعة القوانين الضريبية التى أقرها الكونجرس فى سبتمبر عند ١٩٨٦، تواصل الائتمان الضريبى للأبحاث والتنمية للصناعة،بالرغم من أنها تقلصت من ٢٥% إلى ٢٠%، فى مقابل الزيادات فى الإنفاق على الأبحاث والتنمية، الإضافة إلى ذلك، تضمن مشروع القانون ائتمان ضريبى جديد قدره٢٠%،لاعتمادات جديدة تنفقها الصناعة على الأبحاث والتنمية فى الجامعات.

ويقترح التقرير أيضا خيارات للدعم الفيدرالى المباشر للأبحاث والتنمية الصناعية، وسوف تقدم إحدى آليات التمويل المقترحة منح بواسطة وكالات مثل مؤسسة العلوم القومية من أجل البحث التطبيقى للمصلحة العامة بصناعات التكنولوجيا المتقدمة، وهناك خيار آخر ،لتمويل مشروعات متخصصة بشكل مباشر. وهناك خيار ثالث،سيجعل الحكومة الفيدرالية تشترى الأبحاث والتنمية كما فعلت دائرة الحماية لمساعدة صناعة أشباه الموصلات الأمريكية.

مكتب تقييم التكنولوجيا

Office of Technology Assessment

أنشأ الكونجرس الأمريكى مكتب تقييم التكنولوجيا(OTA) فى عام١٩٧٢، لتزويده بالمشورة فى مجال العلوم والتكنولوجيا، ويقترح آخر تقارير مكتب تقييم

لتكنولوجيا "التكنولوجيا الحيوية التجارية-تحليل دولى"، أن الدعم الحكومى للأبحاث وللتدريب على النظم العلمية المتعلقة بالتكنولوجيا الحيوية،كان مهماً جداً لجعل الولايات المتحدة تحتفظ بموقع الصدارة فى مجال التكنولوجيا الحيوية.ويؤكد تقرير مكتب تقييم التكنولوجيا على الحاجة إلى تمويل البحث فى تكنولوجيات التخمير ولتدريب الطلاب على عمليات الهندسة الحيوية،وهى المجالات التى كما ذكرنا من قبل، تفتقر إليها الولايات المتحدة ،وخصوصا بالنسبة لتنافسها مع اليابان، ويضيف التقرير توصيات أخرى،بأنه يجب على الحكومة أن تمول البحث التطبيقى لتصميم المفاعل الحيوى ولتمويل بيولوجيا الكائنات المجهرية المفيدة لصنع منتجات صناعية، وهناك توصية أخرى لمكتب تقييم التكنولوجيا تتعلق الدعم المتزايد للمزيد من الدراسات الأساسية فى البيولوجيا الجزيئية،وخصوصاً البيولوجيا الجزيئية للنبات.

الأكاديمية القومية للعلوم

The National Academy of Science

تعمل الأكاديمية القومية للعلوم(NAS) من خلال عضويتها المتكونة من علماء الولايات المتحدة البارزين كاستشارى مستقل للحكومة الفيدرالية، وأصدرت الأكاديمية القومية للعلوم فى عام ١٩٨٤،تقرير موجز هيئة مستشارى الأبحاث للعمليات الهندسية والكيميائية للتكنولوجيا الحيوية،الذى يشير أيضاً إلى الحاجة تقوية القاعدة المعرفية لهندسة العمليات الحيوية فى الولايات المتحدة، ويذكر التقرير،أنه بدون هذه القاعدة،فلن تصبح الولايات المتحدة قادرة على الاحتفاظ بدور الريادة فى مجال التكنولوجيا الحيوية.

وعلى الرغم من هذه الحوافز ، فإن أقل من عشرين جامعة أمريكية تعمل حالياً فى برامج متعلقة بالهندسة الكيميائية الحيوية، ولم تخَرج البرامج أكثر من ستين خريجاً سنوياً ممن يحملون درجة الدكتوراه أو الماجستير ،برغم حاجة الولايات المتحدة إلى نحو ضعف إلى ثلاثة أمثال هذا العدد، وفى المقابل،دعمت كل من ألمانيا واليابان والمملكة المتحدة، معاهد التكنولوجيا الحيوية فيدرالياً ،من خلال ميزانيات تشغيل ضخمة، التى جمعت الباحثين الأكاديميين والصناعيين من أجل الأبحاث التنظيمية المتبادلة، ولا توجد حتى الآن معاهد مشابهة لها فى الولايات المتحدة.

وتبعاً لذلك،تتضمن الأهداف التى أوصت بها هيئة المستشارين التابعة للأكاديمية القومية للعلوم زيادة القدرات الهندسية لتصميم نظم لزراعة كميات كبيرة من الخلايا البكتيرية والنباتية والحيوانية، وتوسيع القاعدة المعرفية المطلوبة لاستخلاص وتنقية كميات كبيرة من الجزيئات البيولوجية، وتدريب الجيل القادم من مهندسى الكيمياء الحيوية.

وبالمثل، طالبت الأكاديمية القومية للهندسة فى عام ١٩٨٤،بتأسيس خمسة وعشرين مركزاً للأبحاث الهندسية بتكلفة تصل إلى خمسة وعشرين مليوناً دولار للمركز الواحد،و تقوم مؤسسة العلوم القومية بتحمل نفقاتها، وقد تم حتى الآن الانتهاء من إنشاء أحد عشر مركزاً، تضم مركزاً لأبحاث هندسة عمليات التكنولوجيا الحيوية فى معهد ماساشوستس للكتنولوجيا(MIT)فى كمبردج، ويضم مركز التكنولوجيا الحيوية،الذى يقوم بالإشراف عليه دانيل .أ.وانج Daniel E. Wang الأبحاث الأساسية فى بيولوجيا الخلية، والبيولوجيا الجزيئية مع البحث التطبيقى فى الهندسة الكيميائية.

بالإضافة إلى ذلك،فقد أكدت هيئة مستشـــارى الأكاديميـــة القوميـــة للعلـــوم المختصة بالتكنولوجيا الحيوية فى مجال الزراعة،على أهمية الهندسة الوراثيـــة فى الزراعة، ويؤكد تقرير موجز هيئة مستشارى الأبحاث للعمليـــات الهندســـية والكيميائية للتكنولوجيا الحيوية على الحاجة إلى الأبحاث على نطاق واسع فـــى موضوعات،تتراوح ما بين زيادة نوعية الإنتاج الغذائى وكفاءته إلـــى تحســـين الحماية ضد الآفات العضوية، وتشمل توصيات هيئة المستشارين زيادة تمويل الأبحاث الزراعية فى الوكالات القائمة،والتى من بينها هيئة الزراعة الأمريكية ،ومؤسسة العلوم القومية، والمعاهد القومية للصحةNIH، وهيئة الطاقة.

ويطالب التقرير أيضاً بتقديم منح خاصة قصيرة الأجل لمدة تتراوح ما بـــين خمس إلى عشر سنوات،للمساعدة على دمج طرق جزيئية تضم نظم أكاديمية أو علمية فى البيولوجيا الزراعية الأساسية والتطبيقية، وعلاوة على ذلـــك،تقترح هيئة المستشارين توسيع نطاق منح التدريب للعلماء الشـــبان،وزيادة مكافئـــات تطوير المهنة للباحثين الشبان الحاليين ،وتمويل منح لتقديم إجابات عن مســـائل التنظيم الكيميائى الحيوى والفسيولوجى،وتوفير مصادر للحفاظ على الأصـــول الوراثية النباتية، وتضيف هيئة الاستشاريين ،إن الحاجة إلى قيادة ديناميكية فى تطبيق التكنولوجيا الحيوية،يمكن تتوفر من خلال إنشاء منصب مـــدير علمـــى متفرغ فى مكتب مصلحة الزراعة للمنح ونظم البرامج .

مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا

Office of Science and Technology Policy

تأسس مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا(OSTP) فى عام ١٩٦٢،ويهـــدف إلى تقديم المشورة إلى جهاز الحكومة التنفيذى المعنى بالعلوم والتكنولوجيا،وقد

قدم توصياته للإستراتيجيات المتعلقة بتشجيع التكنولوجيا الحيوية،التى بنيت على أساس تقارير مكتب تقييم التكنولوجيا ومؤسسة العلوم القومية.وقد لعب جـورج .أ. كيوراث A. Keyworth, II George المدير السابق لـمكتب علـوم وسياسـة التكنولوجيا دوراً كبيراً فى إقامة مراكز الأبحاث الهندسية لمؤسسة العلوم القومية ، واقترح كيوارث و انريك بلوك،مدير مؤسسة العلوم القومية تخصيص مبلـغ خمسمائة مليون دولار على مدى عدة سنوات من أجل المراكز البحثية. وفـى عام ١٩٨٥، أنشئت ستة مراكز،خصص إحداها لأبحاث التكنولوجيا الحيويـة. وأنشأت خمسة مراكز أخرى فى عام ١٩٨٦،بالرغم من أنه لـم يخصـص أى منها للتكنولوجيا الحيوية، وقد أنشأت ثلاثة أو أربعة مراكز أخـرى فـى عـد ١٩٨٧.

وعلاوة على ذلك، يهتم مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا بتطبيق التكنولوجي الحيوية فى مجال الاحتياجات المتطورة للزراعة، واقتـرح المكتـب أن تقـود مؤسسة العلوم القومية، وهيئة الزراعة والطاقة بتمويل العديـد مـن المراكـز الفيدرالية للقيام بالأبحاث فى مجال الزراعة والتكنولوجيا الحيوية، وسوف تنمو مشروعات المراكز من خلال مراكز التى تضم نظم علميـة أو أكاديميـة فـى الجامعات، وسوف يضيف برنامج الدعم، الذى سيكون متاحا لخمس سنوات مبلغ ٢٥٠مليون دولار، لمجموعة المنح التنافسية للتكنولوجيا الحيوية النباتية، ويركز البحث المقام فى هذه المراكز على مجالات تتراوح ما بين المقاومة البيولوجيـة للآفات الزراعية إلى الحفاظ على نوعية الميـاه، وسـيتوفر أيضـاً الأمـوال المخصصة لتدريب علماء ما بعد مرحلة الدكتوراه فى أبحاث النبات التى تضـم نظم علمية أو أكاديمية .

وسيظل الالتزام بتنفيذ هذه البرامج سارياً على الرغم من تخفيض الميزانيات التى خولها قانون Gramm-Rudman-Hollings، وأقرها الكونجرس الأمريكى فى عام ١٩٨٥، فى محاولة لضبط العجز المتزايد فى الميزانية. وقد أدلى جون .ب. مكتاجو،John P.McTague المدير التنفيذى فى ذلك الحين لمكتب علوم وسياسة التكنولوجيا بشهادة أمام الكونجرس فى عام ١٩٨٦، ذكر فيها " إننا نطالب بصورة حثيثة بمبادرة لإقامة نظم انضباط متعددة تنبثق من الجامعة، ومراكز علوم وتكنولوجيا بشأن المجالات الضرورية للاحتياجات القومية العريضة والمتعلقة بالتكنولوجيا الصناعية".

ويعتبر مكتاجو أن برنامج مراكز الأبحاث الهندسية لمؤسسة العلوم القومية نموذج عمل جيد للمراكز البحثية المقترحة للتكنولوجيا الحيوية الزراعية، وذكر أن بدء خطط المراكز الهندسيه بداية طيبة،لكنها مجرد بداية، فهذا المفهوم يستحق المحاكاة عبر المنظومة الشاملة لنظم الانضباط المتبادلة فى العلوم والرياضيات والهندسه، وسوف تكون هناك مراكز نظم متبادلة جديدة مختصة بهندسة العمليات الحيوية والزراعة والطاقة والبيئة، والتى ستطور فى غضون خمس سنوات، ويجب أن تساعد هذه المراكز على تضافر جهود الحكومة والجامعة والصناعة ، من أجل تشجيع التطبيقات الصناعية للتكنولوجيا الحيوية.

المعاهد القومية للصحة

The National Institutes of Health

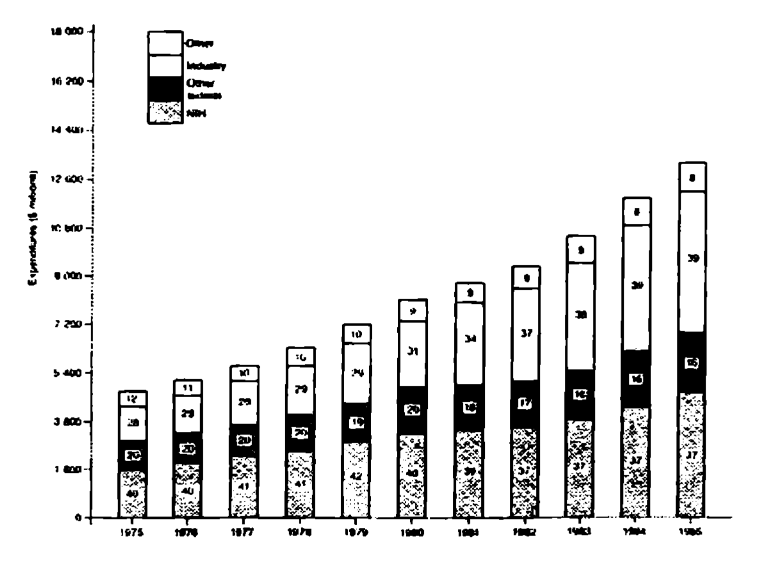
انخفضت نسب الاعتمادات التى أسهمت بها الحكومة الفيدرالية لدعم الأبحاث الطبية الحيوية بدرجة طفيفة خلال العقد السابق،كما انخفض الدعم الذى أسهمت

به المنظمات التى لا تسعى للربح non-profit-making (شكل ١٦-١)، وفى تلك الأثناء أصبحت الأبحاث التى تقوم به الصناعة مهمـا بصـورة متزايـدة. وتفوق المساهمات التى تقدمها الصناعة حالياً ،الإسهامات التى تقدمها المعاهـد القومية للصحة(NIH)،وهى الوكالة الحكومية المختصة بمسؤولية كبـرى فـى القيام بتمويل وأداء البحث الطبى الحيوى.

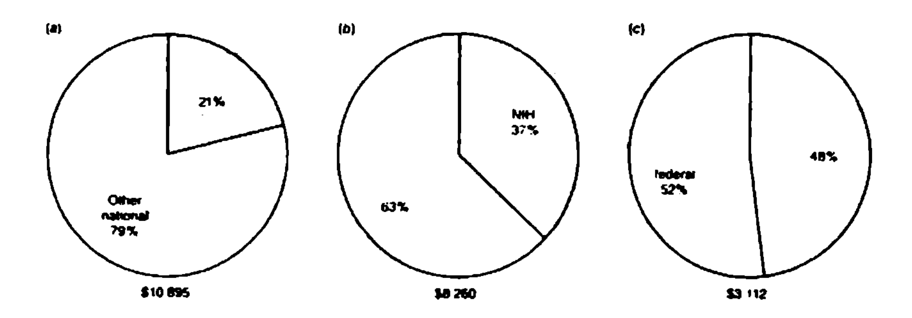
وعلى الرغم من ذلك،تواصل المعاهد القومية للصحة جهودها لتصبح الوكالة الأمريكية الرائدة التى تدعم الأبحاث الأساسـية، ففـى السـنة الماليـة عـام ١٩٨٣،أسهمت العاهد القومية للصحة بنسبة ٢١% مـن كـل الـدعم القـومى للأبحاث الأساسية،وبنسبة ٤٨% من التمويل الفيدرالى للأبحاث الأساسـية فـى الجامعات والكليات(شكل ١٦-٢). وللمعاهد القوميـة للصـحة أيضـاً الـدور الفيدرالى الكبير، فى دعم التكنولوجيا الحيوية فى مجـال الأبحـاث والتنميـة (جدول ١٦-١).

وقد بدأت المعاهد القومية للصحة فى مراجعة رسالتها،لتحديد مـا إذا كانـت هناك اتجاهات جديدة مطلوبة فى مساهماتها لأبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية فى الصناعة ومجال النشاط والبحث المتعلق بالتعليم فى الكليات والجامعـات . وذكر جيمس وايجاردن James Wyngaarden مدير المعهد،أن المعاهد القوميـة للصحة سوف تختبر دورها فى كفالتها لنوع البحث التطبيقى الذى اعتبره واقعاً بين البحث الأساسى،التى كانت تدعمه المعاهد القومية للصحة بصورة تقليديـة والبحث الاحتكارى ،الذى تقوم به الصناعة لتطوير منتجات معينـة، وسـوف تركز أيضا القوة المنتدبة المتمثلة فى القيام بمراجعة شاملة لأنشـطة المعاهـد

القومية للصحة فى مجال التكنولوجيا الحيوية على البحث والتدريب المطلـــوبين لزيادة الخبرة القومية فى جميع المجالات الكبـــرى فـــى صــــناعة التكنولوجيـــا الحيوية.



شكل ١٦ ــ ١ الدعم القومى لأبحاث وتنمية الصحة فى الولايات المتحدة من عام ١٩٧٥ إلى عام ١٩٨٥،الأرقام الموجودة بالأعمدة هى نسب مئوية، فخلال هذا العقد،انخفضت نسب الاعتمادات التى ساهمت بها المعاهد القومية للصحة(NIH) والوكالات الفيدرالية الأخـــرى بدرجة طفيفة،كما حدث انخفاض أيضا فى نسب اعتمادات المؤسسات والمنظمات التى لا تستهدف الربح("الأخرى")،وفى تلــك الأثنـــاء، توسعت الصناعات من دعمها للأبحاث والتنمية فى مجال الصحة.



شكل ١٦ ــ ٢ دعم المعاهد القومية للصحة فى الولايات المتحدة للأبحاث الأساسية فى السنة المالية ١٩٨٣، وتعتبر المعاهد القوميـــة للصحة الوكالة الرائدة فى الولايات المتحدة التى تقدم الاعتمادات للأبحاث الأساسية،حيث تساهم بنسبة ٢١% من التمويـــل الحكـــومى للولايات المتحدة التى تنفقه فى هذا الغرض فى السنة المالية ١٩٨٣(a)،و٣٧% من الأموال التى أنفقتهـــا الحكومـــة الفيدراليـــة(b). وعلاوة على ذلك،يلتى حوالى نصف الدعم الفيدرالى للأبحاث الأساسية فى الكليات والجامعات من المعاهد القومية للصحة (c). والأرقام الموجودة أسفل الدوائر،تبين أجمالى النفقات فى هذه الفئات بالمليون دولار.

جدول ١٦-١ أبحاث التكنولوجيا الحيوية(a) التى تمولها الحكومة الفيدرالية فى الولايات المتحدة فى السنوات المالية من ١٩٨٤ إلى ١٩٨٧.

	Amount of funding (millions of dollars)b			
	1984	1958	1986 (est.)	1987 (budget est.)
National Institutes of Health	1633	1839	1836	1801
Directly related [c]	521	639	636	621
Broader science base[d]	1112	1200	1200	1180
National Science Foundation	61	82	89	109
Department of Agriculture	39	77	74	79
Department of Energy	38	43	43	44
Department of Defense	33	34	43	49
Army	24	22	28	31
Office of Naval Research	9	12	15	18
Department of Commerce/ National Bureau of Standards	1	1	3	4
Environmental Protection Agency	0	2	6	8
Total	1805	2078	2094	2094

a من أجل هذا التحليل،استخدم تعريف مكتب تقييم التكنولوجيا للتكنولوجيا الحيوية :تشمل التكنولوجيا الحيوية أى أسلوب يستخدم الكائنات العضوية الحية(أو أجزاء من الكائنات العضوية) لتصنيع أو تعديل المنتجات،أ و لتحسين النباتات أو الحيوانات،أو لتطوير الكائنات الحية الدقيقة لاستخدامات معينة.

b مقربة إلى أقرب مليون.

c تحدد الـ NIH الأبحاث المرتبطة بصورة مباشرة، بأنها الأبحاث المتضمنة على المعالجة الوراثية،واستنساخ الـ د.ن.أ،واستخدام الأساليب الخاصة بعزل أو الكشف عن الـ د.ن.أ،وخلق الأورام المهجنة وإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ،والطرق الكمبيوترية المستخدمة فى تحليل تسلسلات الـ د.ن.أ والبروتين.

D تشير قاعدة العلوم العريضة إلى البحث المتضمن على التكنولوجيا الحيوية الجديدة ويشمل الاختبارات واسعة النطاق فى الوراثة والبيولوجيا الجزيئية وبيولوجيا الخلية والمناعة.

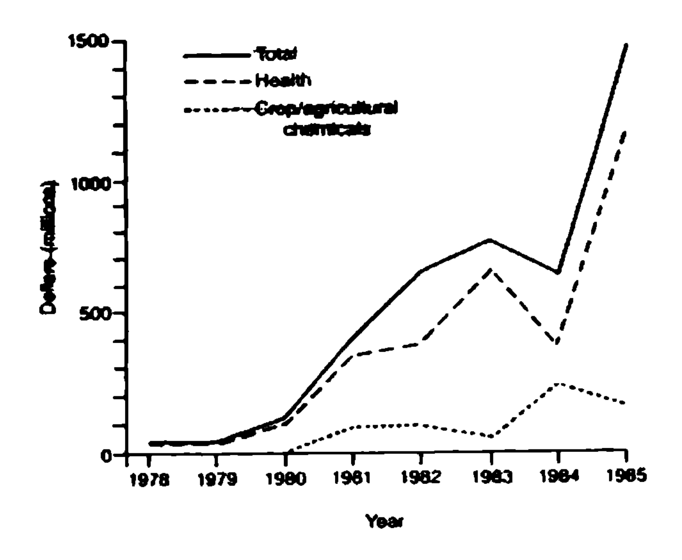
ملحوظة : الميزانيات فى عام ١٩٨٦ و١٩٨٧ ميزانيات تقديرية.

المصدر:تم الحصول على هذه البيانات من مكتب البيت الأبيض للعلوم والسياسة التكنولوجية ومن مسؤولى برامج التكنولوجيا الحيوية فى كل من المصالح والوكالات المعنية.

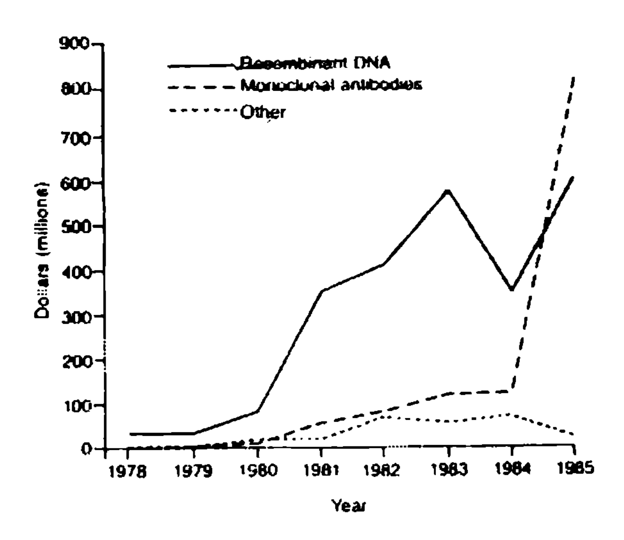
دور الصناعة

The role of industry

بلغ الاستثمار التراكمى للقطاع الخاص فى مجال التكنولوجيا الحيويــة مــع نهاية عام ١٩٨٥ ،اجمالى يزيد قليلاً عن ٤ مليارات دولار،بنسبة ٦٥% مأخوذة من مشتريات حقوق المساهمين ،و١٥%من الاســتثمارات المشــتركة وعقــود الأبحاث،و١٤% من المشاركة المحدودة فى مجال الأبحاث والتنمية، وقد لوحظ أن مجال الصحة له النمو الكبير فى استثمار الصناعة(شــكل ١٦-٣)، وكانــت تذهب معظم الاستثمارات أساساً إلى تكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم،وفى خلال السنتين الماضيتين،ازداد الاستثمار فى مجال تكنولوجيا الجسم المضاد أحــادى الاستنساخ زيادة ملموسة (شكل ١٦-٤).



شكل ١٦ ــ ٣ الدعم الخاص لأبحاث التكنولوجيا الحيوية، ازداد الدعم الخاص لأبحاث التكنولوجيا الحيوية فى الفترة من عام١٩٧٨ إلى عام١٩٨٥من لاشيء تقريباً إلى ألف وخمسمائة مليون دولار فى السنة،وبحجم دعم تراكمى وصل الآن إلى ٤بليون من الــدولارات ، وتتلقى الأبحاث المرتبطة بالصحة نصيب الأسد من الدعم،مع نسبة أقل من الدعم تذهب إلى أبحاث التكنولوجيا الحيوية الزراعية، إلا أن الإسهام فى المجال الزراعى قد تزايد نوعاً ما منذ عام ١٩٨٣.



شكل ١٦ ــ ٤ الاستثمار المتراكم فى مجالات تكنولوجيات حيوية معينة منذ عام ١٩٧٨، على الرغم من أن الاستثمار المبكر فى تكنولوجيا د.ن.أ المطعم كان متفوقاً إلى حد كبير على صور التكنولوجيا الحيوية الأخرى،إلا أن الاستثمار فى تكنولوجيا الجسم المضاد أحادى الاستنساخ،قد تزايد بشكل سريع جداً منذ عام ١٩٨٤.

وتوجه استثمارات الصناعة فى مجال التكنولوجيا الحيوية إلى الجامعات،كما توجه أيضا إلى العمليات التقليدية جداً التى تسعى للربح، وفى عام ١٩٨٤،قدمت الصناعة حوالى ١٢٠مليون دولار للأبحاث الجامعية فى مجـال التكنولوجيـا الحيوية،وعلى الرغم من أن هذه الاعتمادات لا تمثل إلا جزء صغيراً من التزام الصناعة الكلى للأبحاث والتنمية فى التكنولوجيا الحيوية،إلا أن الاستثمار يعـد منتجاً، وقد أنتج البحث الذى تقوم به الجامعات ما يقرب من ربع جميع تطبيقات براءة الاختراع فى التكنولوجيا الحيوية على مدى الخمس سنوات الماضية، وقد يعكس هذا الوضع، حقيقة أن الأبحاث الجامعية التى تدعمها الصناعة،تميل لأن تكون أكثر تطبيقاً من الأبحاث التى تمولها منح المعاهـد القوميـة للصـحة . ويبرهن التمويل من الصناعة للجامعات على فاعليته الناجحة فى التشجيع على نقل نتائج الأبحاث الأساسية إلى التطبيقات التكنولوجية الحيويـة فـى مجـال

الأدوية والمواد الكيميائية والزراعة، ومع ذلك،فإن وصول المنتجات المصنعة إلى السوق، يعتمد على الجانب الآخر من جسور التكنولوجيا الحيوية الذى يتعامل مع الرقابة التنظيمية لتطوير المنتج.

السياسات التنظيمية للتكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة

US biotechnology regulatory policies

فى فبراير عام ١٩٧٥،اتخذت مجموعة دولية من العلماء،خطوة غير مسبوقة للدعوة لعقد اجتماع لدراسة المفاهيم الأخلاقية والأمان فى تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم المكتشفة حديثاً فى ذلك الحين، فالقدرة على تجميع الـ د.ن.أ من أنواع مختلفة،وعلى إدخال جينات غريبة فى الكائنات المجهرية ، قد أثارت مخاوف من أن يتمكن العلماء بطريقة غير مقصودة من تخليق فيروسات جديدة والتى قد ينجم عنها أوبئة مدمرة،أو تفسد بشكل أو آخر التوازن الدقيق للطبيعة.

وإحدى نتائج هذا الاجتماع الذى عقد فى مركز مؤتمرات أسليومار فى باسيفيك جروف بكاليفورنيا،تطوير سلسلة من التوجيهات الإرشادية التى تنظم،وفى بعض الحالات تمنع تجارب الـ د.ن.أ المطعم، وقد صدرت التوجيهات الإرشادية فى الولايات المتحدة تحت رعاية المعاهد القومية للصحة ، وتقضى التوجيهات الإرشادية،من بين أشياء أخرى،بأن تقدم كل التجارب التى تمولها المعاهد القومية للصحة، والمتضمنة على الـ د.ن.أ المطعم إلى اللجنة الاستشارية للـد.ن.أ المطعم التابعة للمعاهد القومية للصحة للموافقة عليها، وطورت دول أخرى توجيهاتها الإرشادية،على الرغم من أنها كانت مشابهة للتوجيهات التى سنتها المعاهد القومية للصحة .

وفى فبراير عام ١٩٨٥، احتفلت الأكاديمية القومية للعلوم بالذكرى السنوية العاشرة لمؤتمر أسيلومار،من خلال عقد ندوة عن التكنولوجيا الحيوية، وصرح ألكسندر رتشAlexander Rich من معهد ماساشوستس للتكتولوجيا في الندوة،أنه تم إجراء مئات الآلاف من تجارب الد.ن.أ المطعم خلال العشر سنوات الماضية،وأن الكثير من المخاوف التى أثيرت بشأن المخاطر المحتملة عن هذه التكنولوجيا فى مؤتمر أسيلومار، قد تم القضاء عليها.

وفى الوقت الراهن ، انتقل محور اهتمام الرأى العام فى الولايات المتحدة من تنظيم أبحاث الد.ن.أ المطعم إلى طبيعة ومجال دور الحكومة في تنظيم التطور الصناعى لمنتجات التكنولوجيا الحيوية، وقد خففت قيود التوجيهات الإرشادية للمعاهد القومية للصحة فى مجال أبحاث الـ د.ن.أ المطعم،والتى طورت فى الفترة ما بين عام ١٩٧٦و١٩٧٨،لما أظهرته الخبرة من مخاطر طفيفة من أنواع التجارب الروتينية فى المعامل ، ومع ذلك،فلا تزال التوجيهات الإرشادية باقية بمثابة معايير قومية لمراقبة الأبحاث التى تدعمها جهات فيدرالية،والتى تؤدى بصورة أساسية فى معامل الجامعات، بيد أن إذعان الصناعة للتوجيهات الإرشادية كان إذعانا تطوعيا ،ولما أصبح التصنيع التجارى لمنتجات تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم حقيقة واقعة،فقد تزايدت الحاجة إلى وجود تنظيم متناسق للإنتاج والتصريح بتداول هذه المنتجات.

لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية

The Biotechnology Science Coordinating Committee

ظل الغموض يخيم على تنظيم منتجات التكنولوجيا الحيوية الأولى،وخصوصاً في تلك الحالات التى كانت فيها المنتجات من كائنات مجهرية متحولة وراثياً،والتى كان يزمع إطلاقها إلى البيئة بطريقة مقصودة ، وكانت متطلبات التنظيم والتى تتطلب إخضاع المنتج للرقابة، ولأنواع التنظيمات المطلوبة، وهوية الوكالة الحكومية التى تكون مسؤولة عن منتج معين يشوبها جميعاً بعض الغموض.

وفى عام ١٩٨٤، أنشئت مجموعة عمل لمجلس استشارى للتكنولوجيا الحيوية تحت رئاسة كيورث لحل هذه الموضوعات، وراجعت مجموعة العمل جميع السياسات الفيدرالية المتعلقة بتنظيم التكنولوجيا الحيوية،وأصدرت تقريرا للرأى العام فى الحادى والثلاثون من ديسمبر عام ١٩٨٤، واستجابة للتعليقات التى تلقاها فيما بعد مكتب علوم وسياسة التكنولوجيا والوكالات الفيدرالية الأخرى،أعلن المكتب عن تأسيس لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية(BSCC) فى الرابع عشر من نوفمبر عام ١٩٨٥.وتتكون اللجنة من كبار ممثلى الوكالات التى ترعى أو تنظم أبحاث التكنولوجيا الحيوية أو منتجاتها، واشتملت اللجنة على ممثلين من المعاهد القومية للصحة ومؤسسة العلوم القومية، ومصلحة الزراعة، ووكالة الحماية البيئية، وهيئة الأغذية والدواء، ويتولى رئاسة هذه اللجنة بالتناوب مساعد مدير العلوم البيولوجية والسلوكية فى مؤسسة العلوم القومية ومدير المعاهد القومية للصحة .

وكانت المسؤولية الأولية الكبرى للجنة،أن تساعد السياسة الداخلية لمجموعة العمل الاستشارية للتكنولوجيا الحيوية علـــى تنميـــة نظـــام متناســـق لتنظـــيم التكنولوجيا الحيوية، هذا النظام الذى أعلن فى السادس عشر من يونيـــو عـــام ١٩٨٦، يضع الخطوط العريضة لمجال اختصاص الوكالات العديدة، والوكالات الثلاث ذات السلطات التنظيمية الرئيسة هى : هيئـــة الأغذيـــة والـــدواء(FDA) وهيئة الزراعة الأمريكية(USDA)ووكالة الحماية البيئية(EPA)، وحددت اللجنة السلطات القانونية لكل وكالة،وبعد ذلك حددت أى من الوكالات التى سيكون لها الريادة فى تنظيم منتجات معينة(جدول ١٦-٢).

واقترحت لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيويـــة أيضـــاً وضـــع تعريفـــات للكائنات العضوية التى تتطلب تنظيم لتقديم أساس علمى عام للرقابة التنظيميـــة بواسطة الوكالات الفيدرالية الفردية، وتبعاً لتوصيات اللجنة، فإن هناك فئتين من الكائنات العضوية ستخضعان للتنظيم، وتشمل الفئة الأولى الكائنات العضـــوية المهندسة وراثياً التى تكونت من الاتحاد المتعمد للمادة الوراثيـــة مـــن أنـــواع مختلفة، وتشمل الفئة الثانية الكائنات المجهريـــة التـــى تعتبـــر ذاتهـــا كائنـــات ممرضة،أو تم تغييرها وراثياً بواسطة جينات من كائنات ممرضـــة، ويعـــرف الكائن الممرض(pathogen)،بأنه فيروس أو كائن مجهرى ، له القـــدرة علـــى إحداث المرض للكائنات الحية الأخرى،سواء أكانت إنسان أم حيوان أم نبات أم كائن مجهرى آخر.

ويمكن أن يعفى كائن عضوى من أى فئة من المراقبـــة،إذا كانـــت المـــادة الوراثية التى يحتويها لا تعتبر أنها تشكل خطراً متزايداً على صحة الإنسان أو البيئة، وستشمل الأمثلة على الكائنات العضوية المهندسة وراثياً،التى تطـــورت

بنقل تسلسل د.ن.أ يتصف بخصائص مميزة ،الذى لا يشفر عن منـــتج جينـــى، حتى لو كان ذلك الــــ د.ن.أ قد جاء في الأصل من كائن ممـــرض(فيـــروس مثلاً)، وتضم هذه التسلسلات تلك التسلسلات المستخدمة فى تنظيم تعبير الجين.

جدول ١٦-٢ وكالات الحكومة الفيدرالية الأمريكية،التى لها مسئولية الموافقة على منتجات التكنولوجيا الحيوية التجارية العديدة،وفقاً لإطار العمل المتناسق للجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية.

Subject	Responsible agency(ies)
Foods/food additives	FDA ", FSISh [b]
Human drugs, medical devices and biological products	FDA
Animal drugs	FDA
Animal biological products	APHIS
Other contained uses	EPA
Plants and animals	APHIS,[a], FSIS,[b] FDA[c']
Pesticide microorganisms released in the environment (all)	EPA,[a] APHIS,d
Other uses (microorganisms):	
١.Intergeneric combination	EPA,U APHIS,d
٢.Intrageneric combination:	
(a) Pathogenic source organism:	
agricultural use	APHIS
non-agricultural use	EPA APHIS,d
(b) No pathogenic source organisms	EPA Report
Non-engineered pathogens	
(i)Agricultural use	APHIS
(ii) Non-agricultural use	EPA.' APHISd
Non-engineered non-pathogens	EPA Report

أ) وكالة رئيسة

ب) تعنى الـــFSIS (خدمة فحص وأمان الغــذاء)متصــل مــن خــلال الســكرتارية المســاعدة للزراعــة لخدمــة الفحــص والتسويق،ومسؤولة عن الاستخدام الغذائى.

جـ) تكون الـــFDA معنية عندما يتعلق الأمر باستخدام الغذاء.

ء) الـــــAPHIS(هى جهة خدمة فحص الصحة الحيوانية والنباتية)،وتكون مسؤولة عندما يكون الكائن العضوى الدقيق آفة نباتية أو ممرض للحيوان أو مادة تنظيمية تتطلب تصريح.

هـ) لا تطبق اشتراطات الـــEPA إلا فى الإطلاق البينى فى ظل استخدام قانون جديد مهم تنوى الــ EPA استخدامه.

وحيث أن اللجنة قد صنفت الكائنات العضوية بغرض المراجعة التنظيمية،فسوف تكون مهمتها التالية تحديد ما يشكل"إطلاق فى البيئة"، ويعتبر هذا التعريف(التحديد) مهماً،لأنه يمهد الطريق لوكالة الحماية البيئية وهيئة الزراعة الأمريكية لتنظيم منتجات التكنولوجيا الحيوية،التى يزمع استخدامها فى التطبيقات الزراعية والكيميائية خارج المعمل أو وحدة التصنيع، ونتيجة لذلك، تنشئ اللجنة مجموعة عمل لتطوير توصيات علمية بشأن الصوبة الزجاجية الملوثة،ولكيفية إجراء تجارب التجارب الحقلية محدودة النطاق ،التى يجب إجرائها قبل التفكير فى إجراء إطلاقات بيئية واسعة الانتشار.

ولجنة تنسيق علوم التكنولوجيا الحيوية من خلال نظامها الشامل،أخذت فى الاعتبار الأهداف العريضة التى كانت قد اقترحتها مجموعة خاصة من خبراء الحكومة،التى دعت إليها منظمة التعاون الاقتصادى والتنمية(OECD)، وفى عام ١٩٨٦،أصدرت المجموعة الخاصة تقريراً بعنوان اعتبارات أمان الـ د.ن.أ المطعم؛ اعتبارات الآمان الصناعية والبيئية والزراعية لأوجه استعمال الكائنات العضوية التى يتم الحصول عليها بأساليب الـ د.ن.أ المطعم ، وطالب التقرير بطرق دولية متناسقة لتنظيم المنتج.

ومن أجل ضمان تبادل البيانات والتقليل من العوائق التجارية،أوصى تقرير منظمة التعاون الاقتصادى والتنمية بمزيد من الدعم للأبحاث والتنمية من أجل اختبار الطرق، وتصميم المعدات، ودراسات التصنيف الميكروبى،لإصدار معلومات تستخدمها منظمات دولية ووطنية مثل، منظمة الصحة العالمية(WHO)

ومفوضية المجموعات الأوروبية، وأوصى التقرير أيضاً بأن التطبيقات الصناعية واسعة النطاق من التكنولوجيا الحيوية،يجب أن تستغل طالما كان ممكناً، الكائنات المجهرية التى تعتبر فى حد ذاتها قليلة الخطورة،وأن تتداول هذه الكائنات فى ظل ظروف"من الممارسة الصناعية المناسبة واسعة النطاق ". وطالب بحث آخر بتحسين أساليب المراقبة والتحكم فى الإطلاق غير المتعمد للكائنات العضوية المهندسة وراثياً التى تستخدم على نطاق واسع فى التطبيقات الصناعية.

هيئة الأغذية والدواء

The Food and Drug Administration

لهيئة الأغذية والدواء(FDA) سلطة تنظيم تصنيع الغذاء والإضافات الغذائية والعقاقير ومستحضرات التجميل، ومن الناحية الفعلية ،تخضع جميع شركات التكنولوجيا الحيوية لإشراف هيئة الأغذية والدواء، لأن العديد من منتجات التكنولوجيا الحيوية موجودة فى مجال الصحة، وحتى الآن،استطاعت هيئة الأغذية والدواء أن تنظم منتجات التكنولوجيا الحيوية دون إجراء تغييرات كبيرة فى وضعها الحالى، وتنص سياسة هيئة الأغذية والدواء على أن"استخدام أسلوب تكنولوجى حيوى معين،لا يتطلب عملية إدارية مختلفة، ويجب أن يتأسس تنظيم هيئة الأغذية والدواء على التقييم العلمى الفعلى للمنتجات،وليس على فروض مسبقة عن أية عمليات معينة".

وتستخدم هيئة الأغذية والدواء وثائق بعنوان " مسائل تؤخذ فى الاعتبار" لتقديم دليل إرشادى عن كيفية تطبيق نظم هيئة الأغذية والدواء على منتجات

التكنولوجيا الحيوية، وهذا الإجراء مرن بدرجة كافية للتكيف مع التغيرات العلمية السريعة وتطورات المنتج، وقد صدرت خمس من هذه الوثائق ، وتتعامل هذه الوثائق مع تصنيع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ للتشخيص المعملى. ومع إنتاج واختبار عقار الإنترفيرون للاستخدام التجريبى على البشر، وتصنيع الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ للأغراض العلاج والتشخيص فى البشر. وإنتاج واختبار العقاقير الجديدة والمواد البيولوجية التى تنتجها تكنولوجيا الـ د.ن.أ المطعم، وتشخيص سلاسل الخلايا المستخدمة لصنع المنتجات البيولوجية.

وتطالب هذه الوثائق بمعلومات محددة عن أصول وصفات كل سلاسل الخلايا التى استخدمت فى صنع المنتجات المعنية ، فهى تطلب على سبيل المثال،فيما إذا كانت الخلايا لها إمكانية إحداث سرطان، وتوضح الوثائق أيضاً بتعبيرات جلية متطلبات شروط الجودة لتقييم نقاء وهوية المنتج، واقترحت عدد من الاختبارات لتوضيح أن المنتج خالياً من الملوثات،سواء أكانت من عوامل معدية أم من د.ن.أ أم من بروتين.

المعاهد القومية للصحة

The National Institutes of Health

تتعاون المعاهد القومية للصحةNIH مع هيئة الأغذية والدواء فى إصدار التوجيهات المختصة بمستقبل استخدام الجينات المستنسخة فى العلاج بالجين للبشر، ويجب أن يوافق على البروتوكولات الإكلينيكية لتجارب العلاج بالجين التى تمولها المعاهد القومية للصحة اللجنة الاستشارية للـ د.ن.أ المطعم التابعة للمعاهد القومية للصحة، والتى تعرف بطريقة أخرى باسم الـRAC،

وللإعداد لهذا،أصدرت المعاهد القومية للصحة وثيقة "مسائل تؤخذ فى الاعتبار" عن تصميم وتقديم بروتوكولات لإدخال جينات جديدة فى الخلايا الجسدية البشرية، وتشير التقديرات بأن هذه التجارب الإكلينيكية قد تبدأ بحلول عام ١٩٨٨(انظر أيضاً الفصل الخامس عشر).

ومما لاشك فيه أن تدقيق الجمهور الكونجرس على المفاهيم الأخلاقية للعلاج بالجين سيستمر،وخصوصاً عند أية محاولة لنقل الجينات إلى سلسلة جرثومية،والتى قد تحدث تغييرا وراثياً دائماً لشخص يجرى له هذا العلاج، إلا أن لم يتم التفكير فى نقل سلسلة جرثومية إلى البشر فى الوقت الحالى.

فى عام ١٩٨٦، طلبت اللجنة التى تتخذ من بوسطن مركز لها والمسؤولة عن الوراثة،من الـ RAC أن تعدل توجيهات المعاهد القومية للصحة المتعلقة بأبحاث الـ د.ن.أ المطعم،لقصر العلاج بجين الخلية الجسدية على "الحالات المهددة للحياة أو التى تؤدى إلى عجز شديد"، وأن تمنع العلاج بالسلسلة الجرثومية، والـ RAC ، التى تعمل بمقتضى لجنتها الفرعية المختصة بالعلاج بالجين بأنه لم تكن مطلوبة تعديلات جديدة للتوجيهات،لم تقم بالتغييرات المقترحة، ولم ترغب لجنة المعاهد القومية للصحة فى أن تتبنى قيود التى من شأنها أن تقلل من مرونتها فى تقديم المشورة المختصة بتجارب العلاج بالجين.

ويحتمل أن تصبح المعاهد القومية للصحة معنية بمجال آخر يتعلق بحقوق المرضى،فالمرضى أقاموا دعوى لإثبات حق ملكيتهم للجينات والخلايا التى تؤخذ منهم أثناء التجارب الإكلينيكية،والتى أظهرت أن لها قيمة تجارية محتملة، ويحتمل أن يدعو هذا الموقف إلى أن تطلب المعاهد القومية للصحة من مجالس

المراجعة الرسمية المحلية ،و المسؤولة عن تحديد ما إذا كان الغرض من التجارب الإكلينيكية التى يقوم بها الباحثون فى المعهد تجارب أخلاقية،أن تتأكد من أن المرضى على دراية كاملة باحتمالات الاستخدام التجارى لأعضاء أجسامهم،قبل أن يشتركوا فى الأبحاث الإكلينيكية، ويراجع مكتب تقييم التكنولوجيا هذا الموضوع أيضاً.

وكالة الحماية البيئية

The Environmental Protection Agency

وكالة الحماية البيئية(EPA) لها سلطة تنظيم الأنشطة،والتى تتضمن على التصنيع الكيميائى، واستخدام مبيد الآفات،التى قد تسبب تلوثاً للأرض أو الهواء أو الماء، وبدأت الوكالة فى الفترة الأخيرة تنظيم التكنولوجيا الحيوية الصناعية فى ظل القانون الفيدرالى للمبيد الحشرى والمبيد الفطرى ومبيد القوارض(FIFRA)،وقانون التحكم فى المواد السامة(TSCA).

وينشأ الاهتمام التنظيمى لوكالة الحماية البيئية من النتائج الخطيرة المحتملة من المنتجات الكيميائية والزراعية،التى تم إنتاجها عن طريق التكنولوجيا الحيوية،ويجرى إطلاقها خارج المعمل، ويمتد الاهتمام إلى الاختبار الحقلى للكائنات العضوية المهندسة وراثياً، وأول هذه الحالات-والتى توضح بعض من الفوضى التنظيمية المبكرة- قد ظهرت عام ١٩٨٣،عندما وافقت الـ RAC التابعة للمعاهد القومية للصحة على إجراء اختبار حقلى لتجربة على سلالة كائن عضوى معدل وراثياً، لمقاومة ضرر الصقيع فى النباتات.

وكان من المزمع أن يقوم بالتجربة ستيفن ليندو Steven Lindow ونيكولاس بانبولوس Nickolas Panopoulos من جامعة كاليفورنيا فى بركيلى، وقد قام هذان الباحثان بتعديل البكتيريا وراثياً التى توجد فى البيئة بصورة طبيعية،من خلال نزع الجين الذى يجعل الخلايا البكتيرية تعمل كمراكز تنوية nucleating centres،لتكوين بلورات الثلج، وكانت الفكرة،أنه عندما ينزع الجين فإن البكتيريا ستكون أقل قدرة على بدء تكوين الصقيع فى النباتات.وبعد أن وافقت لجنة المعاهد القومية للصحة على إجراء التجربة،قام جيرمى ريفكن Jeremy Rifkin من مؤسسة الاتجاهات الاقتصادية واشنطن دى سى،برفع دعوى لإيقاف الاختبار المقترح،على أساس أن المعاهد القومية للصحة فشلت فى تقييم التأثير البيئى لإطلاق الميكروب المعدل ،تبعاً لما يتطلبه قانون السياسات البيئية القومية، وكسب ريفكن الدعوى،وشرعت المعاهد القومية للصحة فى القيام بالتقييم اللازم للبيئة.

إلا أن الموقف قد ازداد تعقيداً،لأن العلوم الوراثية المتقدمة،وهى شركة تعمل فى مجال التكنولوجيا الحيوية فى كاليفورنيا،أرادت بالضرورة القيام بنفس التجربة، وعلى الرغم من أن توجيهات الـ د.ن.أ المطعم لا تتطلب موافقة الـ RAC على التجارب التى لا تدعمها الحكومة مالياً، إلا إن شركة علوم الوراثة المتقدمة قدمت طواعية تجربتها المقترحة للجنة.

وفى تلك الأثناء بدأت وكالة الحماية البيئية فى تطوير خططها الخاصة لتنظيم الميكروبات المعدلة وراثياً،التى يقصد منها الإطلاق إلى البيئة، وسيكون لهذا العمل ميزة ضم الكائنات الحية الدقيقة التى تطورها المؤسسات التجارية،التى لا تشملها توجيهات المعاهد القومية للصحة ، وبعد ذلك،قدمت شركة علوم الوراثة

المتقدمة تجربتها المقترحة لوكالـــة الحمايـــة البيئيـــة كمـــا فعلـــت الشـــركات الأخرى،التى كانت تخطط لتجارب تتضمن على الإطلاق البيئـــى للنباتـــات أو البكتيريا المعدلة وراثياً.

وفى نوفمبر ١٩٨٥، عدلت فى نهاية الأمر المعاهد القومية للصحة توجيهاتها لأبحاث الـــ د.ن.أ المطعم ووافقت على الامتثال لرغبة وكالة فيدرالية أخرى قدمت إليها التجربة،إذا كانت مراجعات كلتا الوكالتين ستتداخلان، وبالنسبة لحالة الميكروب المقاوم للصقيع،قررت المعاهد القومية للصحة أن مراجعـــة وكالـــة الحماية البيئية للتأثير البيئى المحتمل للبكتيريا المعدلة وراثياً ســـتكون كافيـــة، ونتيجة لذلك،قدم الباحثان ليندو وبانوبولوس طلبهما إلى وكالة الحماية البيئية.

وعلى الرغم من أن وكالة الحماية البيئية قد وافقت على طلب شركة علـــوم الوراثة المتقدمة،للسماح لها بإجراء اختبار حقلى للبكتيريا فى نوفمبر ١٩٨٥،إلا أن الشركة اعترفت فى يناير ١٩٨٦ بأنها قامت بإجراء اختبار على الميكروب فى الخلاء – فوق سطح مبنى الشركة– قبل عام من حصولها على تصريح من وكالة الحماية البيئية للإطلاق البيئى، وكانت نتيجة ذلك،أن أعلنت وكالة الحماية البيئية أن الشركة خالفت قوانين الوكالة،وعلقت الموافقة، وفرضت غرامة على الشركة.

وفى اتفاق أعلن فى يونيو عام ١٩٨٦،سحبت وكالة الحماية البيئية اتهاماتها بأن الشركة زيفت البيانات فى طلبها التى قدمته للوكالة، وتخطط الشركة لتقديم طلب للحصول على موافقة، وفى تلك الأثناء،وافقت وكالة الحماية البيئيـــة فـــى شهر مايو على طلب ليندو وبانبولوس للسماح لهما بـــإجراء تجـــاربهم، ومـــع

ذلك،فقد أدى احتجاج المجتمع الذى تجرى فى منطقتـــه التجـــارب والتحـــديات القانونية الأخرى،إلى منع القيام بإجراء التجارب خلال فصل نمو عام١٩٨٦.

وهذه القصة التنظيمية المطولة،التى كانت لها نتيجة ساخرة فى أن البكتيـــر المقاوم للصقيع،الذى أنتج عن طريق إلغاء جين،ستتعرض حالياً لتنظيم صـــارم بدرجة أقل، وفقاً للنظام المنسق الجديد الذى تتبعه لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا، وفى اجتماع الـــــRAC التابعة للمعاهد القومية للصحة الذى عقدته فى سبتمبر عام١٩٨٦،وافقت على دراسة اقتراح يجعل توجيهات المعاهد القومية للصحة لا يشمل إلا الكائنات المجهرية التى تم تعديلها وراثياً بإضافة د.ن.أ غريب،ونتيجة لذلك، تعفى تجارب إلغاء الجين من المراجعة.

وتعفى التوجيهات الحالية تجارب كهذه تجرى فى المعمل، ولكن ليست تحت ظروف من الإنتاج الضخم،أو عندما يكون الإطلاق البيئـــى متضـــمناً، وعلــــى العموم، يجب أن يقدم النظام دليل أفضل فيما يتعلق بالمتطلبات التنظيمية،لكل من الوكالات الحكومية العديدة ولصناعة التكنولوجيا الحيوية،ونتيجة لذلك،يعمل على تقوية خضوع الصناعة لهذه المتطلبات.

وتقوم وكالة الحماية البيئية حالياً بتحديد أبعادها التنظيمية،بالإعلان عـــن أن أقسام الزراعة والمراقبة الداخلية على النباتات والحيوانات،وأن اختصاص سلطة هيئة الأغذية والدواء تشمل الغذاء والإضافات الغذائية والعقاقير ومستحضـــرات التجميل، ويمتد مجال وسلطة وكالة الحماية البيئية من خـــلال قـــانون FIFRA وTSCA ،إلى تنظيم تصنيع مبيدات الآفات والمواد الكيميائية،على الرغم من أن

نطاقاً عريضاً من صناعة التكنولوجيا الحيوية يخضع لمراجعة المنتج من قبل وكالة الحماية البيئية.

وتبنت وكالة الحماية البيئية لتنظيماتها،المبادئ العلمية والمعايير التى أعلنتها لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا من أجل تصنيف الكائنات المجهرية المعدلة وراثياً، والمنتجات الميكروبية التى تصنع من كائنات مجهرية معدلة وراثياً،التى تعتبر هى نفسها كائنات ممرضة،أو تحتوى على مادة وراثية من كائن ممرض،يجب أن تخضع للمراجعة التنظيمية،قبل أن يصرح بإطلاقها إلى البيئة إلا إذا كان الغرض من المنتج للاستخدام الزراعى غير المبيد للآفات فقط ، ففى هذه الحالة،يجب أن يراجع بدلاً من ذلك بواسطة مصلحة الزراعة.

وستراجع وكالة الحماية البيئية أيضاً تنظيم تلك الكائنات المجهرية التى تكونت بواسطة الهندسة الوراثية بمواد لم تأت من مصدر كائنات ممرضة، فالمنتجات الميكروبية،سواء أكانت منتجات مسببة للمرض أم غير مسببة للمرض،ستخضع لمراجعة الـــFIFRA(بالنسبة لمبيدات الآفات)،وتخضع لـــTSCA (بالنسبة للمواد الكيميائية الأخرى)،قبل أن يصرح بإطلاقها للبيئة ،بما فى ذلك الاختبارات الحقلية محدودة النطاق ،والأبحاث الأخرى المتعلقة بالتأثير البيئى من منتج معين.

وعلى الرغم من أن التنظيمات السابقة لوكالة الحماية البيئية للإطلاق البيئى تعفى الاختبارات الحقلية على مساحات أصغر من عشر أفدنة،فإن هذا الإعفاء لا ينطبق على الكائنات المجهرية المعدلة وراثيا، بالإضافة إلى ذلك، الكائنات المجهرية غير المتوطنة فى المنطقة،التى تستخدم كمبيدات آفات،سوف تخضع

للمراجعة التنظيمية بموجب قانون FIFRA، غير أن المراجعة ستكون مختصرة بالنسبة للكائنات المجهرية غير المعدلة وراثياً.

كانت رقابة الكونجرس والأنشطة التشريعية على الإطلاق البيئى لمنتجات التكنولوجيا الحيوية واضحة فى عامي١٩٨٥و١٩٨٦،وسوف تستمر هذه الرقابة من غير شك، وقد قدمت مشروعات قوانين إلى الكونجرس،بشأن تأسيس سلطات منفصلة داخل وكالة الحماية البيئية من أجل تنظيم أبحاث التكنولوجيا الحيوية والاختبار الحقلى وتسويق المنتج.

ويعتمد التنظيم السليم فى المجال البيئى على وجود طرق دقيقة لتقييم مخاطر إطلاق منتج، ولا يزال هناك الكثير من الأبحاث الواجب القيام بها على أوجه عديدة من تقييم المخاطر، ولا يزال هناك الكثير الواجب معرفته،على سبيل المثال،ما السرعة التى تنتقل بها مادة وراثية أدخلت فى كائن عضوى إلى كائنات أخرى فى البيئة المحيطة بها، والتواريخ الطبيعية للبكتيريا وتصنيفها،التى تعيش فى بيئات مائية أو فى التربة تتطلب أيضاً مزيداً من الفحص.

هيئة الزراعة الأمريكية

US Department of Agriculture

تنظم هيئة الزراعة الأمريكية (USDA) منتجات زراعية،تشمل النبات واللحوم ومنتجات الدواجن، وفى مارس عام ١٩٨٦،أصدر مكتب المحاسبة الحكومى الأمريكى(GAO) تقريراً أبرز فيه قصور هيئة الزراعة الأمريكية فى مجال التكنولوجيا الحيوية، وذكر تقرير مكتب المحاسبة الحكومى أن

المصلحة لم يكن لديها هيكل تنظيمي واضح ،وإن لجنة أبحاث الـ د.ن.أ المطعم التابعة لها تفتقر إلى السلطة والتوجيه لمراقبة أبحاث التكنولوجيا الحيوية وتنظيمها، وطالب التقرير بأن الهيكل التنظيمى لهيئة الزراعة الأمريكية يجب أن يكون محدداً بوضوح، واقترحت لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا نظاماً متناسقاً يساعد على مواجهة هذه المشاكل.

وتطبق توجيهات هيئة الزراعة الأمريكية الخاصة بتنظيم التكنولوجيا الحيوية الزراعية على كل مجالات الأبحاث التى تمولها المصلحة، وتتضمن توجيهات المصلحة المتعلقة بأبحاث الـ د.ن.أ المطعم،التى تتأسس جزئياً على توجيهات المعاهد القومية للصحة كل أوجه الأبحاث، فهى تشمل الأبحاث التى تؤدى داخل ظروف معملية ،وعلى أبحاث عزل خاصة ،حسب الأحوال،وعلى سبيل المثال، فى تطوير لقاحات لأمراض خطيرة مثل مرض الفم والقدم، ويأتى الإطلاق البيئى للكائنات المجهرية المعدلة وراثياً أيضاً تحت نطاق السلطة التنظيمية لهيئة الزراعة الأمريكية .

وتتعرف هيئة الزراعة الأمريكية على الكائنات الحية ، التى تنوى تنظيمها وفقاً للتعريفات التى تحصل عليها من لجنة تنسيق علوم التكنولوجيا، وتعتبر اللقاحات من بين المنتجات التى ترغب المصلحة فى تنظيمها للاستخدام البيطرى، وبالنسبة للمنتجات البيولوجية البيطرية،تقدم هيئة الزراعة الأمريكية دليلاً إرشادياً تنظيمياً عن كيفية إجراء التجارب الحقلية التى تتضمن على كائنات مجهرية مهندسة وراثياً وحية،وعن أى بيانات مطلوبة لدعم التطبيقات من إجراء استخراج تصاريح للمنتج.

وتستعلم هيئة الزراعة الأمريكية أيضاً عن تنظيم المنتجات المصنوعة بواسطة الهندسة الوراثية من الآفات النباتية،والتى تعرف بأنها كل الكائنات الحية التي يمكن أن تسبب أمراضاً أو تحدث تلفاً للنباتات، وتعلن الوكالة أن سلطاتها التنظيمية والتشريعية التقليدية فيما يخص البذور واللحوم ومنتجات الدواجن، تطبق على السواء على كل منتجات التكنولوجيا الحيوية فى هذه الفئات،وأنه ليس هناك تغيير مطلوب فى الوقت الحالى.

كان أحد تطبيقات التكنولوجيا الحيوية المحتملة يستدعى قدراً كبيراً من الاهتمام، وهو تطوير سلالات جديدة من الحيوانات الأليفة،عن طريق إدخال جينات جديدة إلى السلاسل الجرثومية للحيوانات، وكما ذكرنا فى الفصل الخامس عشر،فإن الباحثون يسعون إلى تربية عدد أكبر من خنازير وأغنام سريعة النمو،عن طريق نقل جينات هرمون النمو إلى الحيوانات.

وفى عام ١٩٨٥،رفع رفيكن دعوى من أجل وقف تجارب نقل الجين هذه،على أساس أن هيئة الزراعة الأمريكية لم تنشر فقرة التأثير البيئى المطلوبة لهذا البحث، وقد طالب المحكمة بعد ذلك بتأسيس قاعدة بأنه لا يجب أن تكون هناك عراقيل أمام تهجين الحيوانات الثديية، ورفضت محكمة مقاطعة واشنطن وكولومبيا الدعوى فى إبريل عام ١٩٨٦،وذكرت أن فقرة التأثير البيئى لم تكن مطلوبة،لأن البحث لم يتقدم بصورة كافية حتى يجرى هذا التقييم.

هيئة الصحة والآمان المهنى

The Occupational Safety and Health Administration

إن المهمة التى تضطلع بها هيئة الصحة والأمان المهنى (OSHA)،هى توفير مكان عمل آمن للعمال، ووفقا لبيان أخير للوكالة،فإن تنظيماتها الحالية تقدم بالفعل أسس"ملائمة وقابلة للتنفيذ" لحماية العمال بصورة آمنة فى صناعة التكنولوجيا الحيوية، وينص بيان الوكالة على أن" لم تظهر حاجة إلى تنظيمات إضافية لأماكن العمل تستخدم التكنولوجيا الحيوية فى الوقت الحالى،حيث أنه لم يتم التعرف على خطر أو مخاطر من التكنولوجيا الحيوية على وجه الخصوص".

هيئة الدفاع والتجارة

The Commerce and Defense Department

تعتبر ضوابط التصدير، مجال آخر للرقابة التنظيمية، يقع ضمن اختصاصات هيئة التجارة، وهناك خطوات جارية فى هيئة التجارة لوضع مسودة تنظيمات تحكم التكنولوجيا الحيوية، والقضية هى كيفية موازنة المصالح المتضاربة، فتنظيمات التصدير تحفزها إلى حد كبير ظروف الأمن القومى.

وهيئة الدفاع التى تقدم المشورة لهيئة التجارة فى مسائل الأمن القومى، ترغب فى تقييد تصدير التكنولوجيا الحيوية، التى قد تساعد الخصوم المحتملين على شن حرب كيميائية أو بيولوجية، وتصنف تكنولوجيا التخمير وأجهزة الفصل كبيرة السعة فى أول قوائم التصدير التى ستتأثر بهذا التقييد، ومع ذلك،وعلى الرغم من أن ضوابط التصدير قد تكون ضرورية لحماية الأمن

القومى،فإذا كانت هذه الضوابط متشددة أو صارمة،فقد تضر بالمبادلات الدولية التى تعتمد عليها أبحاث التكنولوجيا الحيوية الصناعية والأكاديمية.

ولجنة الرئيس المختصة بالتنافس الصناعى،والتى ذكرناها من قبل،ذكرت أن الأمن القومى وبالإضافة سياسة خارجية ناجحة،يعتمدان على الحفاظ على التنافس الصناعى للولايات المتحدة قائماً،وأن قيود التصدير بصفة عامة تتنافى الأخلاق التنافسية، وقد قامت اللجنة بسن بعض التوصيات الرائعة فى موضوع الدور الفيدرالى فى تطوير سياسات التجارة الدولية،بما فيها تنظيمات التصدير.

ومن بين هذه التوصيات،إنشاء هيئة للتجارة على مستوى وزارى لتحسين صنع سياسة فى هذا المجال،وآلية فعالة أكثر اتساقاً لموازنة السياسات المحلية والسياسات الدولية، وطالبت اللجنة أيضاً بمراجعة قوانين التجارة المحلية،ووضع نظام لسياسة عدم الثقة الأمريكية،لكى تتضمن على إعفاءات للمؤسسات المندمجة التى تشجع الأهداف القومية، وتقترح توصيات أخرى،تبسيط وتنظيم عملية استخراج التصاريح الحالية لكل عمليات التصدير المنضبطة، وتعتبر هذه التغييرات مطلوبة للحفاظ على استجابات تنافسية مع الدول الأخرى، وأخيراً،اقترحت لجنة الرئيس عدة إجراءات لتمويل الصادرات،وانتهت بالمطالبة بنظام تجارى قوى متعدد الجوانب.

وفى داخل الولايات المتحدة،عبرت بعض المجموعات عن مخاوفها من أن تستغل التكنولوجيا الحيوية فى أغراض الحرب البيولوجية، فريفكن،على سبيل المثال، قدم اقتراحاً إلى الــــRAC، حيث طالب بمجموعة عمل لفحص هذه الاستخدامات المحتملة، إلا أن الاقتراح لم يجد أذاناً صاغية ، والشيء الموازى

لهذا فى الأهمية،هو بيان من مصلحة الدفاع،يذكر أن مجموعة العمل المقترحة غير ضرورية،حيث تتجاوب المصلحة بشكل كامل مع سياسة قومية،كما أوضحتها معاهدة الأسلحة البيولوجية فى عام ١٩٧٢،التى تمنع الأبحاث لأغراض الأسلحة البيولوجية، وتؤكد هيئة الدفاع أيضاً على أن كل برامجها البحثية المتضمنة الـ د.ن.أ المطعم،غير مصنفة،وتجرى وفقاً لتوجيهات المعاهد القومية للصحة.

وفى مراجعة لفاعليات معاهدة الأسلحة البيولوجية،التى عقدت فى جنيف فى سبتمبر عام ١٩٨٦،كان الموضوع الأساسى هو سوء الاستخدام المحتمل للتكنولوجيا الحيوية فى الحرب البيولوجية، وقد تم التوصل إلى اتفاقية فى عدد من الخطوات لتبادل المعلومات والبيانات فى مجال الأبحاث والتنمية التكنولوجى الحيوى، لضمان عدم استخدامها فى تطوير أسلحة بيولوجية.

ورفع ريفكن دعوى أيضاً ضد مصلحة الدفاع لكى تؤجل خططها لإنشاء معامل جديدة فيDgway Proving Grounds فى يوتاه ، لاختبار الأيروسولات البيولوجية المهلكة والشديدة العدوى، وتنزعت الدعوى بأن المصلحة فشلت فى الإعداد لبيان عن التأثير البيئى لبرنامج أبحاثها البيولوجى، وأمرت المحكمة بمنع إنشاء المعمل،إلى أن يقوم الجيش بإجراء التقييم المطلوب عن المشاكل البيئية المحتملة،ووافق الجيش على إجرائى، وكما توضح هذه الحالة والاقتراح المقدم إلى الـRAC،إن الجدل الشعبى قد يستمر بشأن الاستخدام الخاطئ المحتمل من التكنولوجيا الحيوية فى الحرب البيولوجية.

الخاتمـــة

Conclusions

لا يزال الاهتمام القومى بشأن مستقبل التنافس فى صـــناعات التكنولوجيـــا الحيوية المحلية اهتماماً متزايداً فى الولايات المتحدة واليابان والدول الأوربيـــة، وفى كل مكان آخر، ولما كانت هذه الدول تناضل من أجل البقاء فـــى حلبـــة التنافس، من خلال المساعدة على النمو الكبير لهذه الصناعات، فمـــن الجـــدير بالذكر معرفة كيف وصلت الولايات المتحدة إلى مركزها الريادى فـــى مجـــال التكنولوجيا الحيوية.

حدد فرانك بريس، الرئيس الحالى للأكاديمية القومية للعلوم خمسة عناصـــر رئيسة ساهمت فى تحقيق هذا الوضع، وهذه العناصر هى:ربع قرن من الـــدعم الفيدرالى للأبحاث فى البيولوجيا الأساسية، ونظام بحث قوى فـــى الجامعـــات المدفوع بمزج حفزى للأبحاث والتعليم، ووجود الإكلينيكيـــون فـــى المعامـــل البحثية،الذين يعرفون أن الفهم الأفضل لتظيم الجين ، سيكون له تأثير قوى على تشخيص ومعالجة الأمراض،وقبول المجتمع العلمى لمسؤولياته فى مصـــارحة الشعب بالمخاطر المحتملة لتكنولوجيا الـــ د.ن.أ المطعم والحاجة إلـــى مراقبـــة مناسبة للبحث من المعاهد القومية للصحة ومجموعاتها الاستشـــارية، والقـــدرة على إجراء أبحاث التكنولوجيا الحيوية دون الحاجة إلى مصادر تمويل ضخمة.

وتوجد بالولايات المتحدة حالياً مشاركة متنامية- بين الحكومة والبحث العلمى والصناعة- ويمهد هذه المشاركة لتدفق اكتشافات العلوم الأساسية وتطبيقاتها فى مجال التكنولوجيا الحيوية، وبالرغم من ذلك، فلإطلاعـــه علـــى الأمـــور بـــأن التكنولوجيا الحيوية، قد ينجم عنها أخطار للإنسان وللبيئة، أشار دافيد بازيلون،

كبير دائرة قضاة المتقاعد فى محكمة استئناف مقاطعة كولومبيا بأمريكا، إلى أن المجتمع يجب أن يكون على دراية " بما هو معروف، وما الذى يخيف وما الذى تعلق عليه الآمال وما الذى يجب تعلمه"، يجب أن يقدم العلم تقييم لأية مخاطر قد تفرضها التكنولوجيا الحيوية، ولكنه هو المجتمع الذى يجب أن يقرر فى النهاية ما إذا كان هذا الخطر يمكن قبوله.

وتتوقف الريادة فى المستقبل فى مجال التكنولوجيا الحيوية فى الولايات المتحدة والدول الأخرى على الدعم المالى الحكومى والسياسات الضريبية للتشجيع على الابتكار التكنولوجى،بالإضافة إلى الاستثمار الحكومى فى برامج أبحاث وتنمية التكنولوجيا الحيوية، والحكومة والجامعة والصناعة التى تتعاون فى ظل مراقبة مستنيرة من الجمهور،سوف تطور قاعدة بيانات قوية لتقييم المخاطر، ومع نمو قاعدة البيانات،سوف تجعل المراجعة التنظيمية الفعالة والسريعة لمنتجات التكنولوجيا الحيوية أن يتحقق وعد التكنولوجيا الحيوية الصناعية على المستوى الدولى،لمصلحة كل من العالم الصناعى والدول الفقيرة.

انتهى بحمد الله وفضله.

مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مع شرح واف لها ،مرتبة حسب الأبجدية الإنجليزية

(A)

* نقص إنزيم أدينوزين ديامينـاز : Adenosine deaminase deficiency
مرض وراثي، يتسبب عن نقص إنزيم أدينوزين ديامينـاز ويؤدي إلى فقد شديد في الاستجابة المناعية التي عادة ما تكون مميتة في السنوات القلائل الأولي من العمر، ويحتمل أن يكون هذا المرض من الأمراض المرشحة للمحاولات الأولى العلاج بالجين.

* بكتيريا الأورام الزراعية: Agrobacterium tumefaciens
نوع من البكتيريا تسبب أورام العفن التاجي في النباتات التي يصيبها، وتنشأ الأورام نتيجة اكتساب د.ن.أ منقول من بلازميد Ti من البكتيريا إلى الخلايا النباتية أثناء الإصابة، وقد تم تحوير بكتيريا الأورام الزراعية لإدخال جينات جديدة إلى المحاصيل النباتية.

* حمض أميني :Amino acid
جزيئات الوحدات البنائية،التي ترتبط ببعضها البعض لتكوين ببتيدات وبروتينات.

* بزل السلي–سحب الصاء:Amniocentesis
هو إجراء يتم من خلاله سحب سائل يحتوي على خلايا جنينية من رحم امرأة حامل،بواسطة إبرة تدخل في جدار البطن، ويمكن تحليل الخلايا للبحث عن وجود علامات لبعض الأمراض الوراثية في الجنين.

* مضاد حيوي:Antibiotic

أي مجموعة من مواد كيميائية متنوعة من حيث التركيب،تنتجها كائنات مجهرية تشمل على البكتيريا والفطريات،التي تقتل الكائنات المجهرية الأخرى، وتستخدم المضادات الحيوية في علاج الأمراض البكتيرية،وثبتت فاعلية بعض المضادات الحيوية في العلاج الكيماوي للسرطان.

* جسم مضاد:Antibody

الأجسام المضادة،هي بروتينات تنتجها الخلايا اللمفيةB الموجودة في الجهاز المناعي، وتساعد في الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة،التي تشمل علي الفيروسات الممرضة والبكتيريا،عن طريق البحث عن الجزيئات الغريبة والارتباط بها .

* مولد المضاد(مستضد) :Antigen

هو بالتحديد،أي جزيء يتعرف على جسم مضاد ويرتبط به،وعادة ما يكون هذا الجزيء المستخدم في إثارة إنتاج الجسم المضاد.

* استِضاد- التولد المضاد:Antigenicity

القدرة على التعرف بجسم مضاد والارتباط به.

* جسم مضاد مضاد لمثال التولد :Anti-idiotype antibody

جسم مضاد يصنع استجابة لجسم مضاد آخر،ويتعرف على مثال تولده، والأجسام المضادة المضادة لمثال التولد يجري اختبارها كلقاحات محتملة.

* صبغة عادية :Autosome

أي كرموسوم غير الكروموسومات المحددة لجنس كائن عضــوي، فالإنســان علي ســبيل المثــال، لــه ٤٦ كروموســووماً،اثنان منهمــا(كروموســومX وكروموسوم Y)،يحددان نوع الفرد،وبقية الكروموسومات تعتبــر صــبغيات عادية.

* مغتذ ذاتي :Autotroph

كائن عضوي يمكنه النمو على ثاني أكسيد الكربون،كمصدره الوحيد من الكربون.

(B)

* باشيلص ثرنجينسيس :Bacillus thuringiensis(B.T)

نوع من البكتيريا يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

* بكتيريا :Bacteria

كائنات عضوية صغيرة بدائية التنوي ،لا توجد بها نواة،وعادة ما تكــون ذات جدران خلوية صلبة، وعلى الرغم من أن بعض البكتيريــا تســبب المــرض للإنسان،إلا أن معظمها مفيد لكل من الطبيعة(علي سبيل المثال،تلك الأنواع من البكتيريا التي تقوم بتثبيت النتروجين أو التي تهدم المادة العضوية) ولصناعة التكنولوجيا الحيوية .

* شبه بكتيري(بكترواني):Bacteroid

الشكل الذي تتخذه البكتيريا من جنس البكتيريا الجذريــة،في العقــد المثبتــة للنتروجين على جذور النباتات البقولية.

* فيروس عصوي :Baculovirus

نوع من الفيروسات يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

* ازدواج قاعدي:Base-pairing

في حلزون الـــ د.ن.أ المزدوج،ترتبط الجديلتان ببعضهما بروابط ضعيفة،التي تصل القواعد البارزة من إحدى السلاسل بقواعد السلسلة الأخرى، وتتزاوج القواعد بحيث تتصل قاعدة الأدنين بقاعدة الثيامين، وتتصل قاعدة الجوانين بقاعدة السيتوسين، وهكذا يحدد تسلسل إحدى جدائل الـــ د.ن.أ تسلسل الجديلة الأخرى.

* غسل حيوي:Bioleaching

استخدام المحاليل المحتوية على البكتيريا لإذابة واستخلاص معادن نفيسة من الخامات.

* تعدين حيوي:Biomining

استخدام البكتيريا في استخلاص معادن نفيسة من الخامات، وبما أنه يجـــري حاليا تكوين طرق تعدين حيوي ،فعادة ما تستخدم هذه الطرق مع خامات ذات جودة منخفضة ، يكون فيها استخراج المعدن بالطرق التقليدية غير مجد مـــن الناحية الاقتصادية.

* مفاعل حيوي:Bioreactor

عبارة عن وعاء كبير أو خزان تتم فيه عملية التخمـــر، وتـــزود المفـــاعلات الحيوية بعدة أجهزة لمراقبة وضبط التفاعلات في الخزان،بحيث يتم التفاعـــل بصورة فعالة.

* تكنولوجيا حيوية :Biotechnology

استخدام كائنات عضوية حية أو مواد تصنعها كائنات عضـوية حيـة لصـنع منتجات ذات فائدة للإنسان.

* خلية لمفيةB : B lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تنتج أجسام مضادة،عندما تنشط بصورة ملائمـة. وترمزB إلى كيس فابرسيوس bursa of fabricius،وهو العضو الذي تنضـج فيه الخلاياB داخل الدجاجة، ولا يزال العضو المشابه له في الثـدييات غيـر معروف،

(c)

* كالوس :Callus

كتلة من الخلايا غير متميزة تتكون على جروح النبات،وتنتجها أيضاً الأنسجة النباتية النامية في مزارع الخلية النباتية.

* كربوهيدرات:Carbohydrate

مركبات بيولوجية تحتوي على الكربون والهيدروجين والأكسجين،وعادة ما ترتبط ذرة الكربون بذرتين من الهيدروجين وذرة واحدة من الأكسجين، وتشمل الكربوهيدرات السكريات البسيطة مثل الجلوكوز والجزيئات الأكثر تعقيداً،مثل النشا والسليلوز،التي تتحد فيها العديد من السكريات لتكوين بوليمرات كبيرة.

* حامل المرض:Carrier

شخص يحمل ويستطيع أن ينقل جين مرض وراثي، لكنه لا يصاب بالمرض. وتسبب الجينات المتنحية العديد من الأمراض الوراثية،والتي يجب أن يـورث منها نسختان حتى تحدث الإصابة؛وحامل المرض الذي لديه نسخة واحدة مـن جين متنحي ،لا تظهر عليه أية أعراض للمرض.

* خلية :Cell

الوحدة الأساسية التي تتكون منها الكائنات العضوية الحية. وتتكـون بعـض الكائنات العضوية مثل البكتيريا من خلية واحدة فقط،في حين تتكـون بعـض الكائنات الأخرى كالإنسان من بلايين الخلايا.

* مزارع الخلية:Cell culture

خلايا أو أنسجة نامية على مادة غذائية معينة في أطباق المعمل.

* أجسام مضادة خيمرية:Chimeric antibodies

أجسام مضادة،تتكون فيها سلاسل البروتينات الفردانية من قطع مختلفة من نوعين(من الكائنات الحية) ، وأغلب التكوينات الموجودة حالياً من الإنسان والفأر.

* جبيلة اليخضور:Chloroplast

نوع من الجسيمات الغشائية توجد في الخلايا النباتية،وتعتبر مركز لعملية التمثيل الضوئي.

* فحص عينة حية من الزغبات المشيمية:Chorionic villus biopsy
هو إجراء يتم من خلاله إزالة عينة صغيرة من نسيج الزغب(الزغب أحد أغشية الجنين)،وفحصها للكشف عن التشوهات الجنينية،وخاصة تلك التشوهات الناشئة عن مصدر وراثي.

* كروماتين :Chromatin
مركب من البروتين والـــ د.ن.أ،تتكون منه الكروموسومات.

* كروموسومات:Chromosomes
تركيبات شبيهة بالخيوط في نواة الخلية،تحتوي على الجينات في مصفوفة طولية،وتحتوي كل خلية جسدية من الخلايا سليمة التنوي على مجموعة مزدوجة من الكروموسومات.

* مستنسخ :Clone
مجموعة من الخلايا المتماثلة جينياً أو الكائنات العضوية التي تنحدر جميعها بطريقة غير جنسية من نفس الفرد.(انظر أيضاً استنساخ الجين).

* كودون: Codon
تسلسل من ثلاث نكليوتيدات متتالية،يوجد في الـــ د.ن.أ أو الـــ ر.ن.أ،والتي إما أن يحدد حمضاً أمينياً واحداً في بروتين أو يستخدم كعلامة إشارة توقيف في نهاية جين.

* عامل مساعد:Cofactor
جزيء صغير أساسي للنشاط الحفزي لإنزيم.

* حماية متبادلة:Cross-protection
هي حالة تظهر عندما تصاب خلية من إحدى السلالات الفيروسية،فتحميها الإصابة بالعدوى من أن تصاب من سلالة فيروسية أخرى تنتمي لنفس نوع الفيروس.

* تدرن تاجي:Crown gall
ورم يتكون في النباتات ثنائية الفلقة بسبب عدوى من بكتيريا الأورام الزراعية،وينشأ الورم نتيجة نقل الـ د.ن.أ من بلازميد Ti من البكتيريا إلى النبات.

* مزرعة:Culture
انظر مزرعة الخلية.

(D)

* حمض ريبي نووي منقوص الأكسجين:DNA (Deoxyribonucleic acid)
أحد نوعي الحمض النووي،وهو المادة التي تتكون منها الجينات، وتتكون جديلة الـ د.ن.أ من ارتباط العديد من الوحدات البنائية الفردانية ببعضها البعض، والتي تسمى بالنكليوتيدات في جزيء كبير، ويعين التسلسل الطولي للنكليوتيدات، التسلسل الطولي للأحماض الأمينية في بروتين منتج جيني.

* ريبوز منقوص الأكسجين :Deoxyribose
سكر موجود في الأحماض النووية،وخاصة في الأحماض الريبية النووية منقوصة الأكسجين.

* نبات ثنائي الفلقة:Dicotyledonous plant
إحدى الرتبتين تحت الفرعيتين الرئيسيتن، وتحتوي أجنة النباتات ثنائية الفلقة على أوراق ذات فلقتين، ومن النباتات ثنائية الفلقة: الأشجار والشجيرات والعديد من المحاصيل النباتية المعروفة مثل الطماطم والبطاطس والتبغ.

* د.ن.أ : DNA
انظر الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين.

* إنزيم بلمرة د.ن.أ : DNA polymerase
الإنزيم الذي ينسخ د.ن.أ للمادة الوراثية عندما تتضاعف قبل انقسام الخلية.

* جين سائد : Dominant gene
هو ذلك الجين الذي تكفي وراثة نسخة واحدة منه لإضفاء الصفة المحددة.

* حلزون مزدوج: Double helix
التركيب الثلاثي الأبعاد للـــ د.ن.أ، الذي تلتف فيه جديلتي الجزيء معاً بشكل حلزوني منتظم.

(E)

* متماثلات الصورة :Enantiomers
مركبات تعتبر صور مرآوية من بعضها البعض، ويمكن أن توجد في مركب ترتبط فيه أربع مجموعات بديلة مختلفة بنفس ذرة الكربون.

* **معزز: Enhancer**

تسسلسل د.ن.أ منظم يرتبط بجين، ويعمل على زيادة نسخ هذا الجين في ر.ن.أ الرسول.

* **إنزيم: Enzyme**

بروتينات تعمل كمحفزات بيولوجية، إذ تسرع من معدلات التفاعلات الكيميائية في الكائنات الحية، ومعظم الإنزيمات شديدة التخصص وتعمل في نطاق محدود جداً من الجزيئات.

* **بكتيريا القولون : Escherchia coli (E. coli)**

بكتيريا شهيرة، تعيش من بين أماكن أخرى في داخل القناة المعوية، وقد أجريت معظم الأبحاث الأساسية لفهم الأسس الكيميائية الحيوية للحياة على بكتيريا القولون، وتستخدم حالياً سلالات معملية من البكتيريا في التكنولوجيا الحيوية لاستنساخ الجين وصنع بروتينات مطعمة.

* **خلية سوية التنوي: Eukaryote**

أي كائن عضوي تكون فيه للخلايا نواة حقيقية محاطة بغشاء، وتعتبر الخلايا سليمة التنوي عادة شكلاً أكثر تطور من أشكال الحياة عن الخلايا بدائية التنوي.

* **نشوء: Evolution**

تطور أشكال جديدة للحياة من أنواع سابقة الوجود.

(F)

*** حمض دهني: Fatty acid**

أحماض عضوية توجد في الدهون، وأيضاً كوسائط في مسارات منتجة للطاقة مثل دورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل، وللأحماض الدهنية عدد من التطبيقات المتنوعة،فيمكن أن تستخدم على سبيل المثال، كعوامل مكسبة للنكهة وكمشحمات.

*** مواد أولية كيميائية: Feedstock chemicals**

مواد كيميائية تستخدم بكميات كبيرة كمواد بادئة لتصنيع مواد كيميائية أخرى.

*** تخمر: Fermentation**

استخدام الكائنات المجهرية،أو في بعض الحالات الإنزيمات المستخرجة من كائنات مجهرية في إجراء أحد التفاعلات الكيميائية العديدة، والمثال التقليدي للتخمر ،تحول السكر إلى كحول بواسطة الخميرة.

*** مخمر: Fermentor**

الخزان أو أي جهاز آخر تتم فيه تفاعلات التخمير، وعادة ما يزود المخمر بوسائل لمراقبة وضبط حالات التفاعل التي تتم بداخله.

(G)

*** جين: Gene**

يشفر الجين الذي يعتبر الوحدة الأساسية للوراثة عن صفة محددة يمكن أن تنتقل من جيل لجيل آخر،وبتعبير جزيئي، فإن الجين يعتبر قطعة من حمض

نووي،عادة ما يكون حمضاً نووياً منقوص الأكسجين،يحدد تركيـــب سلســلة بروتينية واحدة.

* استنساخ الجين: Gene cloning

استخدام تكنولوجيا الـــ د.ن.أ لعزل وإنتاج كميات كبيرة من جين فردي.

* مكتبة جينية: Gene library

مجموعة من مستنسخات خلوية، عادة ما تكون حالياً خلايا بكتيرية، يحتـــوي كل منها قطعة د.ن.أ من مصدر معين، وتتكون المكتبة الجينية، على ســبيل المثال، من مستنسخات خلوية تحتوي على قطع من د.ن.أ بشري.

* علاج بالجين : Gene Therapy

علاج مرض وراثي بشري عن طريق إدخال جين جديد في المـــريض للقيـــام بوظيفة الجين المعيب الذي يسبب المرض.

* مرض وراثي: Genetic disease

مرض يسببه جين معيب، ويمكن أن ينتقل من جيل لجيل.

* هندسة وراثية: Genetic engineering

استخدام طرق الـــ د.ن.أ المطعم لإضفاء صفات جديدة على الكائنات العضوية، عن طريق إدخال جينات جديدة في خلاياها.

* مجموعة العوامل الوراثية: Genome

التركيب الجيني الكامل لكائن عضوي.

* خلايا جرثومية : Germ cells

الخلايا التي ينشأ منها الحيوان المنوي في الذكور والبويضات في الإناث.

* انحلال السكر(لمركبات بسيطة): Glycolysis

سلسلة من التفاعلات تبدأ بهدم جلوكوز السكر وتنتهي بإطلاق كمية صغيرة من الطاقة تستخدمها الخلية، ويحدث تخمر السكر إلى كحول في الخميرة من خلال المسار الهدمي للسكر.

* مرض رفض الطعم للعائل : Graft-versus-host disease

حالة تحدث للأشخاص الذين يجرون عمليات زرع نخاع العظم، ويسببه النخاع المنقول(الطعم) منتجاً خلايا مناعية تقوم بمهاجمة أنسجة المريض وتعتبرها أنسجة غريبة.

(H)

* هيموجلوبين: Haemoglobin

الجزيء الحامل للأكسجين في خلايا الدم الحمراء، يتكون الهيموجلوبين من أربع سلاسل بروتينية: اثنتان كل منها بروتين جلوبين ألفا، واثنتان كل منها بروتين جلوبين بيتا، بالإضافة إلى صبغة الهيم الملونة للدم.

* مرض مورث: Hereditary disease

مرض يمكن أن ينتقل من جيل لجيل آخر ويكون بسبب جين معيب.

* مختلف الاغتذاء : Heterotroph

كائن عضوي لا يستطيع أن ينم على ثاني أكسيد الكربـون، ولكـن يجـب أن يحصل على مصادر كربونية أكثر تعقداً مثل السكريات.

* لاقحة مختلفة الصبغيات : Heterozygote

تورث الجينات في صورة أزواج،يأتي أحد الزوجين من الأم والآخر من الأب، والفرد متباين اللواقح هو الشخص الذي يتكون فيه زوج اللواقح من نـوعين مختلفين من جين معين، فجين جلوبين بيتا، على سـبيل المثـال، يمكـن أن يتزاوج مع جين خلية منجلية.

* لاقحة متجانسة الصبغيات: Homozygote

هو الشخص الذي تكون لديه نسختيا زوج جين معين متماثلتان.

* هرمون: Hormone

مادة نشطة بيولوجيا، تنتج من أحد أجزاء الجسم ويحملها الدم إلى جزء آخـر حيث تحدث فيه تأثيراتها.

* تهجين: Hybridization

١- في البيولوجيا الجزيئية: هو إجراء يتم من خلاله مزج جزيئـات حمـض نووي وحيد الجديلة،إما من د.ن.أ أو ر.ن.أ. فإذا كان للجزيئين تركيب متماثل فإنهما يتهجنن، أي يرتبطان ببعضها البعض وفقاً لقوانين التزاوج القاعـدي، ويمكن استخدام الإجراء ليقدم دليلاً عن درجة قرابة جينين، أو للكشـف عـن جزيئات الـ ر.ن.أ أو الـ د.ن.أ باستخدام مجس حمض نووي متخصص.

٢-تهجين نوعين لتكوين هجن لها بعض خصائص كل من الأب والأم .

* ورم هجين: Hybridoma

تصنع الخلية المهجنة بدمج خلية لمفيةB منتجة للجسم المضاد مع خلية ورم نخاعي، وتعد الأورام الهجينية مصدراً للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

* إنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفروبوسيل ترانسفيراز:-Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HPRT)

إنزيم أساسي في تخليق الوحدات البنائية للأحماض النووية، ونقص هبرت الذي ينشأ عن جين معيب، يسبب مرض ليسك- نيهان.

* مثال التولد: Idiotype

موقع مميز لجسم مضاد معين،فمثال التولد الذي يقع بداخل أو بالقرب من مركز ارتباط مستضد لجسم مضاد،يمكنه أن يحفز بنفسه إنتاج الجسم المضاد وقد يكون له شكل متمم لشكل المستضد الذي يتعرف عليه الجسم المضاد ويرتبط به.

* استمناع: Immunogenicity

القدرة على إحداث استجابة مناعية.

* إنترفيرونات: Interferons

مجموعة من بروتينات ذات صلة لها عدة أنشطة في الجسم، وتتضمن هذه الأنشطة على مقاومة العدوى الفيروسية، وتحفيز قدرات القتل الخلوي لبعض أنواع من الخلايا المناعية، ويجري اختبار الإنترفيرونات في علاج السرطان وأعراض نقص المناعة المسمى بالإيدز.

* إنترليوكينات: Interleukins

مجموعة من البروتينات تنقل إشارات النمو والتطور بين الخلايـــا المناعيـــة، وهي ضرورية من أجل زيادة الاستجابات المناعية الطبيعة، والإنترليوكين-٢، على سبيل المثال،يجرى عليه تجارب إكلينيكية لعلاج السرطان والإيدز.

(L)

* هيموجلوبين بقولي: Leghaemoglobin

نوع من الهيموجلوبين يوجد في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتـــات البقولية، ويرتبط الهيموجلوبين البقولي بشدة بالأكســجين، وإلا فإنـــه يســـمم الإنزيمات المثبتة للنتروجين.

* بقل: Legume

أحد أفراد مجموعة من النباتات تشتمل على البازلاء والفاصـــوليا والبرســـيم الحجازي، وتستطيع البقوليات أن تصنع علاقات تكافلية مع البكتيريا المثبتـــة للنتروجين من جنس البكتيريا الجذرية.

* مرض ليسك-نيهان: Lesch-Nyhan disease

مرض وراثي يسببه جين معيب لإنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفوريبوســـيل ترنسفيراز(HPRT)، وتتصف الحالة بتركيزات متزايدة من حمض البوليك في الدم، وأعراض عصبية تشتمل على تخلف عقلي وإجبار المريض على جـــدع نفسه.

* تحليل الارتباط: Linkage analysis

ارتباط تغير تركيبي معين في الـ د.ن.أ بوجود جين طافر يمكنه أن يسبب مرضاً وراثياً، ويمكن استخدام تحليل الارتباط في تشخيص الأمراض الوراثية والكشف عن حاملي الجين.

* تكرارات طرفية طويلة: Long terminal repeats(LTRs)

تسلسلات د.ن.أ مزدوجة وجدت في نهايات مجموعات العوامل الوراثية لفيروسات معينة، وهي تحمل إشارات لازمة للتعبير عن الجينات الفيروسية.

(M)

* انقسام اختزالي: Meiosis

انقسام نووي في الخلايا الجرثومية، ينشأ عنه انتصاف عدد الكروموسومات، بحيث تستقبل خلايا البويضات أو الحيوانات المنوية الناتجة مجموعة واحدة فقط من الكروموسومات، بدلاً من المجموعة المزدوجة الموجودة في كل خلية جسدية.

* ر.ن.أ رسول: Messenger RNA (mRNA)

صورة من صور ر.ن.أ تنسخ من د.ن.أ الجينات، بحيث أن تركيبه يحتوي على "رسالة" مشفرة في الجين، ويحمل ر.ن.أ الرسول هذه الرسالة إلى الريبوسومات حيث توجه تخليق البروتين.

* أيض: Metabolism

المجموع الكلي للتفاعلات الكيميائية الحيوية في الخلية.

* فتل خيطي(ميتاكوندريا): Mitochondrin

جسيم محاط بغشاء،يعتبر مركز التفاعلات الرئيسة المنتجة للطاقة في الخلية،التي تشمل على دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل.

* انقسام فتيلي:Mitosis

انقسام نووي في الخلايا الجسدية، وقبل أن تنقسم الخلية،تتضاعف الكروموسومات بحيث أن كل خلية وليدة ستتكون تستقبل مجموعة مزدوجة كاملة من الكروموسومات.

* جسم مضاد أحادي الاستنساخ: Monoclonal antibody

جسم مضاد ينتج بواسطة مستنسخ ورم هجين، ولما كانت جميع الخلايا في مستنسخ متماثلة،فإنها تنتج جميعاً نفس جزء الجسم المضاد، وتقدم تكنولوجيا الجسم المضاد أحادي الاستنساخ طريقة لإنتاج كميات غير محدودة من جسم مضاد نقي.

* نبات وحيد الفلقة: Monocotyledonous plant(monocot)

أحد رتبتين كبيرتين من النباتات، وللنباتات وحيدة الفلقة أجنة ذات ورقة بزرية واحدة(ورقة جنينية ترافق بزور الزهريات)، وينتمي إلى هذه الرتبة النجيليات والمحاصيل الحبوبية الرئيسة والقمح والذرة والأرز. (انظر أيضاً ثنائية الفلقة).

* تولد الطفرة: Mutagenesis

إدخال تغييرات على جينات الكائن العضوي.

* **طافر:** Mutant

كائن عضوى حدثت به بعض التغيرات بسبب طفر جيني.

* **تبدل(طفرة):** Mutation

أي تغير في د.ن.أ جين ينتج عنه بعض تغيرات في الكائن العضوي الحامل لهذا الجين.

* **ورم نخاعي:** Myeloma

ورم الخلايا اللمفيةB المنتجة للجسم المضاد. وتستخدم خلايا الورم النخاعي في صنع ورم الهجين لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

(N)

* **جينات نف:** nif genes

مركب من الجينات ضروري من أجل تثبيت النتروجين، ولا تحمل جينات نف إلا عديمة التنوي التي تضم بكتيريا معينة والطحالب الخضراء والزرقاء، غير أنه يمكن لبعض من هذه الكائنات العضوية أن تكون علاقات تكافلية حميمة مع النباتات الخضراء وخاصة البقوليات.

* **نتروجيناز:** Nitrogenase

مركب إنزيمي يقوم باختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا أثناء التثبيت البيولوجي للنتروجين.

* **تثبيت النتروجين:** Nitrogen fixation

اختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا، وهذا التفاعل الذي يتطلب قدراً كبيراً من الطاقة يمكن إجراؤه بطريقة بيولوجية أو كيميائية.

* **تكون عقد أزوتية:** Nodulation

تكون العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات بواسطة بكتيريا، مثل البكتيريا الجذرية، التي تكون علاقات تكافلية مع البقوليات.

* **حمض نووي:** Nucleic acid

جزيئات تتكون من عمود فقري من مجموعات السكر والفوسفات المتبادلة،التي تبرز منها بعض القواعد العضوية التي تتصل بمجموعات السكر، وسميت الأحماض النووية بذلك، لأنها كانت تعزل في الأصل من نوى الخلايا، وتشمل هذه الأحماض على الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين، الذي يشكل المادة الوراثية، والأحماض الريبية النووية.

* **نكليوتيد:** Nucleotide

جزئ يتكون من سكر مرتبط به مجموعة فوسفات وقاعدة عضوية، وتعتبر النكليوتيدات وحدات بناء الأحماض النووية.

* **نواة:** Nucleus

التركيب الأكثر وضوحاً داخل خلية سليمات التنوي،وتحاط النواة بغشاء وتحتوي على الكروموسومات.

* مولد ورم: Oncogene

جين يمكنه أن يجعل الخلايا تصاب بتحول سرطاني، وتعتبر مولـدات الـورم صور شاذة من الجينات الخلوية الطبيعية اللازمة للنمو والتمايز.

(P)

* كائن ممرض: Pathogen

أي كائن مجهري أو فيروس يسبب مرض.

* ببتيد: Peptide

جزئ يتكون من وصل حمضين أمينين وربما مائة حمض ببعضها الـبعض.(انظر أيضاً البروتين).

* تمثيل ضوئي: Photosynthesis

تحول ثاني أكسيد الكربون والماء إلى مواد كربوهيدراتية بواسطة النباتـات، باستخدام الضوء كمصدر للطاقة.

* بلازميد: Plasmid

جزئ من د.ن.أ،صغير وعادة ما يكون حلقي،ويوجد في البكتيريا وليس جـزء من الكروموسوم البكتيري، وقد تم اتخاذ البلازميدات التي تحمل أعداداً قليلـة من الجينات كمتجهات لنقل الجينات بين الأنواع.

* مبلمر(مضاعف الأصل): Polymer

جزئ كبير يتكون من وصل العديد من الوحدات البنائيـــة البســيطة ببعضـــها البعض، والبروتينات والأحماض النووية وعديد السكريات تعتبر أمثلـــة مـــن المبلمرات الموجودة بصورة طبيعية.

* عديد السكريات: Polysaccharide

مواد كربوهيدراتية كبيرة تتكون من وصل العديد من جزيئات السكر ببعضها، ومثال لذلك، النشا والسليلوز.

* بدائية النواة: Prokaryote

كائنات عضوية من بينها البكتيريا، تتكون عادة من خلية وحيدة لا توجد بهـــا نواة، وتعتبر بدائيات التنوي عادة أشكال من الحياة أقل تقـــدم مـــن ســـليمات التنوي.

* محرض (مثير) : Promoter

تسلسل د.ن.أ منظم يكون مقترناً بجين، وهو ضروري من أجل البدء الـــدقيق لنسخ جين.

* بروتين: Protein

مبلمر بيولوجي يتكون من وصل عدة أحماض أمينية ببعضـــها، والاخـــتلاف الأساسي بين الببتيدات والبروتينات هو الحجم،فالبروتينات عـــادة لهـــا أوزان جزيئية أكبر من ١٠٠٠٠، في حين أن الأوزان الجزيئية للببتيدات أقـــل مـــن ١٠٠٠٠، ومع ذلك، فقد تتداخل الفئتان، وتعمل البروتينات كإنزيمات وتساعد أيضاً على تكوين تركيبات خلوية.

* جبلة الخلية النباتية: Protoplast

خلية نباتية نزع منها جدارها السليلوزي الصلب، وتستخدم جبلات الخلايا النباتية في إنتاج هجن الخلايا الجسدية، وتستخدم أيضاً كأهداف لنقل الجين في الهندسة الوراثية النباتية.

(R)

* مستقبل: Receptor

جزئ يكون عادة بروتين، يوجد على الغشاء الخارجي للخلية، ويتعرف المستقبل ويرتبط برسول ضمنخلوي محدد، مثل هرمون أو عامل نمو، ومن ثم يبدأ في إحداث تأثيرات الرسول داخل الخلية.

* جين متنحي: Recessive gene

هو الجين الذي يشفر عن صفة لا تظهر إلا إذا وجدت نسختان من الجين، والعديد من الأمراض الوراثية تنشأ بسبب جينات متنحية.

* د.ن.أ مطعم : Recombinant DNA

جزئ د.ن.أ يتكون من اتحاد قطع د.ن.أ من مصدرين أو أكثر.

* بروتين مطعم: Recombinant protein

بروتين يتكون عادة في البكتيريا أو الخميرة أو الخلايا المستزرعة،كمنتج جيني في جزئ د.ن.أ مطعم، والعديد من البروتينات البشرية ذات الأهمية المحتملة إكلينيكيا تصنع حالياً كبروتينات مطعمة.

* إنزيم قطع: Restriction enzyme

إنزيم بكتيري يقطع الــ د.ن.أ عند تسلسل نكليوتيدي محدد، وتستخدم إنزيمات القطع في صنع الــ د.ن.أ المطعم، ولصنع خريطة جينيــة، وفــي تشــخيص الأمراض الوراثية.

* تعــدد شــكل طــول قطعــة التحديــد : Restriction fragment length polymorphism(RFLP)

تغير في طول القطع الناتجة عندما يهضم إنزيم قطع عينة د.ن.أ، ويكون مــن نتيجته تغير في تسلسل الــ د.ن.أ. وتســتخدم الــــRFLP فــي تشــخيص الأمراض الوراثية.

* خريطة تحديد: Restriction mapping

رسم خريطة لجزئ د.ن.أ عن طريق هضمه بإنزيمات القطع، وسوف يكــون لكل جزئ د.ن.أ نمطه المميز من المراكز التي تتعرف عليها الإنزيمات، ويمكن أن تستخدم الخرائط نتيجة لذلك في مقارنة قرابة جزيئات د.ن.أ من مصــادر مختلفة.

* فيروس رجعي: Retrovirus

أية مجموعة من الفيروسات تكون مادتها الوراثية هي الــ ر.ن.أ بدلاً من الــ د.ن.أ،وتشمل دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الــ ر.ن.أ الفيروسي فــي الــ د.ن.أ.

* بكتيريا جذرية: Rhizobium

جنس من البكتيريا يشمل على الأنواع المثبتة للنتروجين التي تكون علاقــات تكافلية مع النباتات البقولية.

* حمض الريبونكليك(ر.ن.أ) : Ribonucleic acid (RNA)

أحد الحمضين النوويين الرئيسين، ويشبه تركيب الـ ر.ن.أ تركيب الـ د.ن.أ، غير أنه يحتوي على ريبوز السكر بدلاً الريبوز المنقوص الأكسجين، ويشمل الـ ر.ن.أ على ر.ن.أ الرسول، والـ ر.ن.أ الريبوسومي، والـ ر.ن.أ الناقل.

* ريبوز:Ribose

سكر يوجد في الأحماض الريبية النووية.

* ر.ن.أ ريبوسومي: Ribosomal RNA (rRNA)

نوع من الـ ر.ن.أ يجمع بين بروتينات عديدة لتكوين جسيمات ريباسية .

* جسيم ريباسي:Ribosome

جزىء ضمنخلوي يتكون من بروتينات، ور.ن.أ ريبوسومي، والجسيمات الريباسية هي مراكز تخليق البروتين.

* فيروس رجعي: Retrovirus

أية مجموعة من الفيروسات لها مادة وراثية من الـ ر.ن.أ بدلا من الـ د.ن.أ، وتتضمن دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الـ ر.ن.أ الفيروسي إلى د.ن.أ، ويجري تطوير الفيروسات الرجعية كي تستخدم كمتجهات لنقل الجين.

* ر.ن.أ : RNA

انظر حمض الريبونكليك.

(S)

* أنيميا الخلية المنجلية: Sickle cell anaemia

شكل وراثي من الأنيميا يسببه عيب في الجين المشفر عن بيتا-جلوبين، وهو أحد البروتينين اللذين يتكون منها الهيموجلوبين.

* بروتين كائنات وحيدة الخلية:Single-cell protein

بروتينات تنتجها كائنات وحيدة الخلية، مثل البكتيريا والفطريـات والطحالـب لاستخدامها في الغذاء الحيواني أو الآدمي.

* تباينات في مزارع الأنسجة:Somaclonal variation

قابلية للتغير الوراثي تحدث في النباتات التي تجددت من خلايا محفوظـة فـي مزارع الخلايا والأنسجة، ويمكن أن تنشأ القابلية للتغير حتى في الخلايا التـي جاءت في الأصل من نفس النبات ويتوقع منها أن تكون متماثلـة التركيبـات الوراثية.

* خلية جسدية: Somatic cell

أي نوع من خلايا كائن عضوي ما عدا الخلايا الجرثومية.

* هجين الخلية الجسدية:Somatic cell hybrid

هجين ينتج عن دمج خلايا جسدية من نوعين مختلفين، وخاصة من الأنـواع النباتية.

* خلية جذعية: Stem cell

شكل غير ناضج من خلية نخاع العظم، وهي تنقسم لتكوين ذرية، يعمل البعض منها على البقاء على مجموعة الخلية الجذعية، بينما ينتج عن البعض الآخر كل سلالات الخلايا الرئيسة التي تنشأ من نخاع العظم.

* ستيرويد(شبيهات الكوليسترول): Steroid

عضو من فئة مركبات ذات تركيب رئيس،يحتوي على حلقة بها خمس ذرات كربون، وثلاث حلقات بكل منها ست ذرات كربون، والكوليسترول هو ستيرويد مثل هرمونات الجنس الذكرية والأنثوية وبعض الهرمونات الأخرى التي تنظم توازن الملح والماء والأيض.

* ركيزة: Substrate

مركب يؤثر عليه إنزيم، ومن ثم يحوله إلى مركب آخر.

* سكر: Sugar

شكل بسيط من الكربوهيدرات وعادة ما يكون حلو، وبعض أنواع السكر مثل الجلوكوز تعتبر مصادر طاقة للخلايا، وتعتبر أيضاً وحدات بناء لعديدات سكريات، مثل النشا والسليلوز.

* تكافل: Symbiosis

علاقة يعيش من خلالها فردان من نوعين مختلفين معاً على منفعة متبادلة، ومثال لذلك، العلاقة بين البكتيريا الجذرية المثبتة للنتروجين والنباتات البقولية.

* خلية لمفية T : T lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تقوم بعدة وظائف مطلوبة من أجـل الاسـتجابات المناعية الطبيعية، وبعض الخلايا اللمفية خلايا قاتلة، حيث تقوم بتدمير الخلايا التي تتعرف عليها بأنها غريبة(الخلايا المصابة بالفيروس،على سبيل المثال)، وتعمل خلايا T أخرى كمنظمات- إما مساعدة أو كابحة- للخلايا المناعية، بما فيها الخلايا اللمفيةB المنتجة للجسم المضاد، وتشير T إلى الغدة السـعترية، وهي العضو الذي تنضج فيه الخلايا اللمفيةT.

* فقر الدم البحري: Thalassaemia

نوع من أنيميا الوراثة الذي يسبب فيه جين معيب نقصان أو غياب كامل لأحد بروتيني جزيء الهيموجلوبين.

* ثيوباشيلص فروكسيداتز: Thiobacillus ferooxidans

نوع من البكتيريا يستخدم في التعدين الحيوي.

* بلازميد Ti : Ti plasmid

بلازميد تحمله بكتيريا الأورام الزراعية، وتنقل البكتيريا البلازميد إلى الخلايـا النباتية، حيث يعمل على تكوين التدرن التاجي، ويجري حالياً استخدام أشـكال معدلة من بلازميد Tiفي الهندسة الوراثية للنباتات.

* منشط نسيج مولد البلازمين: Tissue plasminogen activator(TPA)

هو إنزيم يحول نذير مولد بلازمين الخامل إلى مولد بلازمين إنزيم نشط، يعمل على إذابة جلطات الدم، والـ TPA التي تصنع بواسطة تكنولوجيا الـــ د.ن.أ

المطعم يجري اختبارها إكلينيكياً لاستخدامها في إذابة جلطات الدم المتكونة في الشرايين التاجية في المصابين بالنوبات القلبية.

* **نسخ:** Transcription

نسخ الجينات من د.ن.أ في ر.ن.أ الرسول، الذي يعتبر الخطوة الأولى في تعبير الجين.

* **ر.ن.أ ناقل:** Transfer RNA (t RNA)

نوع من الـ ر.ن.أ يلتقط الأحماض الأمينية وينقلها إلى الجسيمات الريباسية حيث يتم تخليق البروتين، ويصفها في الوضع الصحيح على ر.ن.أ الرسول، بحيث يمكن أن ترتبط ببعضها لتكوين بروتين.

* **تحول :** Transformation

١-إدخال جينات غريبة في الخلايا التي تكتسب نتيجة لذلك بعض الصفات المميزة.

٢-تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية.

* **ببتيد عابر:** Transit peptide

ببتيد يحتوى على حوالي من ١٥ إلى ٢٥ ببتيداً وترتبط ببروتين، ويوجه الببتيد العابر البروتين إلى وجهته الأخيرة داخل أو خارج الخلية، ثم يزال بعد ذلك.

* **انتقال:** Translation

تحول تسلسل نكليوتيدي لر.ن.أ رسول إلى تسلسل حمض أميني لبروتين أثناء تخليق البروتين.

* **عنصر انتقالي:** Transposable element

قطعة د.ن.أ يمكنها التحرك داخل مجموعة العوامل الوراثية، ويمكنها أن تحدث طفرات إذا دخلت جين، والعناصر الانتقالية التي تسمى أيضاً ترانسبوزونات يجري اختبارها حالياً كمتجهات محتملة لنقل الجين.

* **دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل:** Tricarboxylic acid (TCA) cycle

أحد المسارات الرئيسة للأيض في الخلية،وينتج عن دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل معظم الطاقة المنبعثة أثناء هدم السكريات والدهون، وسميت الدورة بذلك نسبة إلى المركب الأول في المسار.

(V)

* **لقاح:** Vaccine

مستحضر يدخل في الجسم لتحفيز المناعة ضد كائن ممرض، عادة ما يكون فيروس أو بكتيريا، وتصنع معظم اللقاحات من الكائن الممرض نفسه، الذي إما أن يكون ميتا أو موهناً، بحيث لا يمكنه أن يحدث المرض.

* **متجه:** Vector

في التكنولوجيا الحيوية، جزىء د.ن.أ يكون عادة بلازميد أو د.ن.أ فيروسي، يستخدم لنقل الجينات إلى الخلايا.

* **فيروس:** Virus

جسيمات تتكون من لب حمض نووي، التي إما أن تكون د.ن.أ أو ر.ن.أ محاطة بغلاف بروتيني، والفيروسات هي طفيليات تتناسل بدخولها الخلايا وتقوم بآلية التخليق للخلايا.

مسرد بالمصطلحات الواردة بالكتاب مع شرح واف لها،وقد رتبت حسب الأبجدية العربية.

(أ)

- أجسام مضادة خيمرية:Chimeric antibodies

أجسام مضادة،تتكون فيها سلاسل البروتينات الفردانية من قطع مختلفة من نوعين(من الكائنات الحية) ، وأغلب التكوينات الموجودة حالياً من الإنسان والفأر.

- ازدواج قاعدي:Base-pairing

في حلزون الـــ د.ن.أ المزدوج،ترتبط الجديلتان ببعضهما بروابط ضعيفة،التي تصل القواعد البارزة من إحدى السلاسل بقواعد السلسلة الأخرى، وتتزاوج القواعد بحيث تتصل قاعدة الأدنين بقاعدة الثيامين، وتتصل قاعدة الجوانين بقاعدة السيتوسين، وهكذا يحدد تسلسل إحدى جدائل الــ د.ن.أ تسلسل الجديلة الأخرى.

- استضاد- التولد المضاد:Antigenicity

القدرة على التعرف بجسم مضاد والارتباط به.

- استمناع: Immunogenicity

القدرة على إحداث استجابة مناعية.

- استنساخ الجين: Gene cloning

استخدام تكنولوجيا الـ د.ن.أ لعزل وإنتاج كميات كبيرة من جين فردي.

- إنترفيرونات: Interferons

مجموعة من بروتينات ذات صلة لها عدة أنشطة في الجسم، وتتضـــمن هـــذه الأنشطة على مقاومة العدوى الفيروسية، وتحفيز قدرات القتل الخلوي لبعض أنواع من الخلايا المناعية، ويجري اختبار الإنترفيرونات في علاج الســـرطان وأعراض نقص المناعة المسمى بالإيدز.

- إنترليوكينات: Interleukins

مجموعة من البروتينات تنقل إشارات النمو والتطور بين الخلايـــا المناعيـــة، وهي ضرورية من أجل زيادة الاستجابات المناعية الطبيعية، والإنترليوكين-٢، على سبيل المثال،يجرى عليه تجارب إكلينيكية لعلاج السرطان والإيدز.

- انتقال: Translation

تحول تسلسل نكليوتيدي لر.ن.أ رسول إلى تسلسل حمض أميني لبروتين أثناء تخليق البروتين.

- انحلال السكر(لمركبات بسيطة): Glycolysis

سلسلة من التفاعلات تبدأ بهدم جلوكوز السكر وتنتهي بإطلاق كمية صـــغيرة من الطاقة تستخدمها الخلية، ويحدث تخمر السكر إلى كحول في الخميرة مـــن خلال المسار الهدمي للسكر.

- انقسام اختزالي: Meiosis

انقسام نووي في الخلايا الجرثومية، ينشأ عنه انتصاف عدد الكروموسومات، بحيث تستقبل خلايا البويضات أو الحيوانات المنوية الناتجة مجموعة واحـــدة

فقط من الكروموسومات، بدلاً من المجموعة المزدوجة الموجودة في كل خلية جسدية.

- انقسام فتيلي:Mitosis
انقسام نووي في الخلايا الجسدية، وقبل أن تنقسم الخلية،تتضاعف الكروموسومات بحيث أن كل خلية وليدة ستتكون تستقبل مجموعة مزدوجة كاملة من الكروموسومات.

- أنيميا الخلية المنجلية: Sickle cell anaemia
شكل وراثي من الأنيميا يسببه عيب في الجين المشفر عن جلوبين بيتا، وهو أحد البروتينين اللذين يتكون منها الهيموجلوبين.

- إنزيم: Enzyme
بروتينات تعمل كمحفزات بيولوجية، إذ تسرع من معدلات التفاعلات الكيميائية في الكائنات الحية، ومعظم الإنزيمات شديدة التخصص وتعمل في نطاق محدود جداً من الجزيئات.

- إنزيم قطع: Restriction enzyme
إنزيم بكتيري يقطع الـ د.ن.أ عند تسلسل نكليوتيدي محدد، وتستخدم إنزيمات القطع في صنع الـ د.ن.أ المطعم، ولصنع خريطة جينية، وفي تشخيص الأمراض الوراثية.

- إنزيم بلمرة د.ن.أ : DNA polymerase
الإنزيم الذي ينسخ د.ن.أ للمادة الوراثية عندما تتضاعف قبل انقسام الخلية.

- إنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفروبوسيل ترانسفيراز:-Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase(HPRT)

إنزيم أساسي في تخليق الوحدات البنائية للأحماض النووية، ونقص هبرت الذي ينشأ عن جين معيب، يسبب مرض ليسك- نيهان.

- أيض: Metabolism

المجموع الكلي للتفاعلات الكيميائية الحيوية في الخلية.

(ب)

- ببتيد: Peptide

جزىء يتكون من وصل حمضين أمينين وربما مائة حمض ببعضها البعض.(انظر أيضاً البروتين).

- ببتيد عابر: Transit peptide

ببتيد يحتوى على حوالي من ١٥ إلى ٢٥ ببتيداً وترتبط ببروتين، ويوجه الببتيد العابر البروتين إلى وجهته الأخيرة داخل أو خارج الخلية، ثم يزال بعد ذلك.

- بدائية النواة: Prokaryote

كائنات عضوية من بينها البكتيريا، تتكون عادة من خلية وحيدة لا توجد بها نواة، وتعتبر بدائيات النوى عادة أشكال من الحياة أقل تقدم من سليمات النوى.

- بروتين: Protein

مبلمر بيولوجي يتكون من وصل عدة أحماض أمينية ببعضها، والاختلاف الأساسي بين الببتيدات والبروتينات هو الحجم،فالبروتينات عادة لها أوزان جزيئية أكبر من ١٠٠٠٠، في حين أن الأوزان الجزيئية للببتيدات أقل من ١٠٠٠٠. ومع ذلك، فقد تتداخل الفئتان، وتعمل البروتينات كإنزيمات وتساعد أيضاً على تكوين تركيبات خلوية.

- بروتين كائنات وحيدة الخلية:Single-cell protein

بروتينات تنتجها كائنات وحيدة الخلية، مثل البكتيريا والفطريات والطحالب لاستخدامها في الغذاء الحيواني أو الآدمي.

- بروتين مطعم: Recombinant protein

بروتين يتكون عادة في البكتيريا أو الخميرة أو الخلايا المستزرعة،كمنتج جيني في جزئ د.ن.أ مطعم، والعديد من البروتينات البشرية ذات الأهمية المحتملة إكلينيكياً تصنع حالياً كبروتينات مطعمة.

- بزل السلي-سحب الصاء:Amniocentesis

هو إجراء يتم من خلاله سحب سائل يحتوي على خلايا جنينية من رحم امرأة حامل،بواسطة إبرة تدخل في جدار البطن، ويمكن تحليل الخلايا للبحث عن وجود علامات لبعض الأمراض الوراثية في الجنين.

- بكتيريا: Bacteria

كائنات عضوية صغيرة بدائية التنوي ،لا توجد بها نواة،وعادة ما تكون ذات جدران خلوية صلبة، وعلى الرغم من أن بعض البكتيريا تسبب المرض

للإنسان،إلا أن معظمها مفيد لكل من الطبيعة(علي سبيل المثال،تلك الأنواع من البكتيريا التي تقوم بتثبيت النتروجين أو التي تهدم المادة العضوية) ولصناعة التكنولوجيا الحيوية .

- بكتيريا القولون : Escherchia coli (E. coli)
بكتيريا شهيرة، تعيش من بين أماكن أخرى في داخل القناة المعوية، وقد أجريت معظم الأبحاث الأساسية لفهم الأسس الكيميائية الحيوية للحياة على بكتيريا القولون، وتستخدم حاليا سلالات معملية من البكتيريا في التكنولوجيا الحيوية لاستنساخ الجين وصنع بروتينات مطعمة

- بكتيريا الأورام الزراعية: Agrobacterium tumefaciens
نوع من البكتيريا تسبب أورام العفن التاجي في النباتات التي يصيبها، وتنشأ الأورام نتيجة اكتساب د.ن.أ منقول من بلازميد Ti من البكتيريا إلى الخلايا النباتية أثناء الإصابة، وقد تم تحوير بكتيريا الأورام الزراعية لإدخال جينات جديدة إلى المحاصيل النباتية.

- بكتيريا جذرية: Rhizobium
جنس من البكتيريا يشمل على الأنواع المثبتة للنتروجين التي تكون علاقـات تكافلية مع النباتات البقولية.

- شبه بكتيري(بكترواني):Bacteroid
الشكل الذي تتخذه البكتيريا من جنس البكتيريا الجذريـة،في العقـد المثبتـة للنتروجين على جذور النباتات البقولية.

- بلازميد: Plasmid

جزيء من د.ن.أ،صغير وعادة ما يكون حلقي،ويوجد في البكتيريا وليس جزء من الكروموسوم البكتيري، وقد تم اتخاذ البلازميدات التي تحمل أعداد قليلة من الجينات كمتجهات لنقل الجينات بين الأنواع.

- بلازميد Ti : Ti plasmid

بلازميد تحمله بكتيريا الأورام الزراعية، وتنقل البكتيريا البلازميد إلى الخلايا النباتية، حيث يعمل على تكوين التدرن التاجي، ويجري حالياً استخدام أشكال معدلة من بلازميد Ti في الهندسة الوراثية للنباتات.

(ت)

- تباينات في مزارع الأنسجة:Somaclonal variation

قابلية للتغير الوراثي تحدث في النباتات التي تجددت من خلايا محفوظة في مزارع الخلايا والأنسجة، ويمكن أن تنشأ القابلية للتغير حتى في الخلايا التي جاءت في الأصل من نفس النبات ويتوقع منها أن تكون متماثلة التركيبات الوراثية.

- تبدل(طفرة): Mutation

أي تغير في د.ن.أ جين ينتج عنه بعض تغيرات في الكائن العضوي الحامل لهذا الجين.

- تثبيت النتروجين: Nitrogen fixation

اختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا، وهذا التفاعل الذي يتطلب قدراً كبيراً من الطاقة يمكن إجراؤه بطريقة بيولوجية أو كيميائية.

- **تحليل الارتباط:** Linkage analysis

ارتباط تغير تركيبي معين في الـ د.ن.أ بوجود جين طافر يمكنه أن يسبب مرضاً وراثياً، ويمكن استخدام تحليل الارتباط في تشخيص الأمراض الوراثية والكشف عن حاملي الجين.

- **تحول :** Transformation

١-إدخال جينات غريبة في الخلايا التي تكتسب نتيجة لذلك بعض الصفات المميزة.

٢-تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية.

تولد الطفرة: Mutagenesis

إدخال تغييرات على جينات الكائن العضوي.

- **تخمر:** Fermentation

استخدام الكائنات المجهرية،أو في بعض الحالات الإنزيمات المستخرجة من كائنات مجهرية في إجراء أحد التفاعلات الكيميائية العديدة، والمثال التقليدي للتخمر ،تحول السكر إلى كحول بواسطة الخميرة.

- **تدرن تاجي:**Crown gall

ورم يتكون في النباتات ثنائية الفلقة بسبب عدوى من بكتيريا الأورام الزراعية،وينشأ الورم نتيجة نقل الـ د.ن.أ من بلازميد Ti من البكتيريا إلى النبات.

- تعــدد شــكل طــول قطعــة التحديــد : Restriction fragment length polymorphism(RFLP)

تغير في طول القطع الناتجة عندما يهضم إنزيم قطع عينة د.ن.أ، ويكون مــن نتيجته تغير في تسلسل الـــ د.ن.أ، وتســتخدم الـــــRFLP فــي تشــخيص الأمراض الوراثية.

- تعدين حيوي:Biomining

استخدام البكتيريا في استخلاص معادن نفيسة من الخامات، وبما أنه يجــري حالياً تكوين طرق تعدين حيوي ،فعادة ما تستخدم هذه الطرق مع خامات ذات جودة منخفضة ، يكون فيها استخراج المعدن بالطرق التقليدية غير مجد مــن الناحية الاقتصادية.

- تكافل: Symbiosis

علاقة يعيش من خلالها فردين من نوعين مختلفين معاً على منفعة متبادلـــة، ومثال لذلك، العلاقة بين البكتيريا الجذريـــة المثبتـــة للنتـــروجين والنباتـــات البقولية.

- تكرارات طرفية طويلة: Long terminal repeats(LTRs)

تسلسلات د.ن.أ مزدوجة وجدت في نهايات مجموعـــات العوامـــل الوراثيـــة لفيروسات معينة، وهي تحمل إشارات لازمة للتعبير عن الجينات الفيروسية.

- تكنولوجيا حيوية :Biotechnology

استخدام كائنات عضوية حية أو مواد تصنعها كائنات عضــوية حيـــة لصـــنع منتجات ذات فائدة للإنسان.

- تكون عقد أزوتية: Nodulation

تكون العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتات بواسطة بكتيريا، مثل البكتيريا الجذرية، التي تكون علاقات تكافلية مع البقوليات.

- تمثيل ضوئي: Photosynthesis

تحول ثاني أكسيد الكربون والماء إلى مواد كربوهيدراتية بواسطة النباتات، باستخدام الضوء كمصدر للطاقة.

- تهجين: Hybridization

١- في البيولوجيا الجزيئية: هو إجراء يتم من خلاله مزج جزيئات حمض نووي وحيد الجديلة،إما من د.ن.أ أو ر.ن.أ. فإذا كان للجزيئين تركيب متماثل فإنهما يتهجنان، أي يرتبطان ببعضها البعض وفقاً لقوانين التزاوج القاعدي، ويمكن استخدام الإجراء ليقدم دليلاً عن درجة قرابة جينين، أو للكشف عن جزيئات الـ ر.ن.أ أو الـ د.ن.أ باستخدام مجس حمض نووي متخصص.

٢-تهجين نوعين لتكوين هجن لها بعض خصائص كل من الأب والأم .

(ث)

ثيوباشيلص فروكسيدانز: Thiobacillus ferooxidans

نوع من البكتيريا يستخدم في التعدين الحيوي.

(ج)

- جبلة الخلية النباتية: Protoplast

خلية نباتية نزع منها جدارها السليلوزي الصلب، وتستخدم جـبلات الخلايـا النباتية في إنتاج هجن الخلايا الجسدية، وتستخدم أيضاً كأهداف لنقل الجين في الهندسة الوراثية النباتية.

- جبيلة اليخضور: Chloroplast

نوع من الجسيمات الغشائية توجد في الخلايا النباتية،وتعتبر مركزاً لعملية التمثيل الضوئي.

- جسم مضاد: Antibody

الأجسام المضادة،هي بروتينات تنتجها الخلايا اللمفيةB الموجودة في الجهاز المناعي، وتساعد في الدفاع عن الجسم ضد الأجسام الغريبة،التي تشمل على الفيروسات الممرضة والبكتيريا،عن طريق البحث عـن الجزيئـات الغريبـة والارتباط بها .

- جسم مضاد أحادي الاستنساخ: Monoclonal antibody

جسم مضاد ينتج بواسطة مستنسخ ورم هجين، ولما كانت جميع الخلايا فـي مستنسخ متماثلة،فإنها تنتج جميعاً نفس جزء الجسم المضاد، وتقدم تكنولوجيا الجسم المضاد أحادي الاستنساخ طريقة لإنتاج كميات غير محدودة من جسـم مضاد نقي.

- **جسم مضاد مضاد لمثال التولد** :Anti-idiotype antibody

جسم مضاد يصنع استجابة لجسم مضاد آخر،ويتعرف على مثال تولده، والأجسام المضادة المضادة لمثال التولد يجري اختبارها كلقاحات محتملة.

- **جسيم ريباسي**:Ribosome

جزيء ضمنخلوي يتكون من بروتينـــات، ور.ن.أ ريبوســـومي. والجســـيمات الريباسية هي مراكز تخليق البروتين.

- **جين**: Gene

يشفر الجين الذي يعتبر الوحدة الأساسية للوراثة عن صفة محددة يمكـــن أن تنتقل من جيل لجيل آخر،وبتعبير جزيئي، فإن الجين يعتبر قطعة من حمـــض نووي،عادة ما يكون حمض نووي منقوص الأكسجين،يحدد تركيـــب سلســـلة بروتينية واحدة.

- **جين سائد** : Dominant gene

هو ذلك الجين الذي تكفي وراثة نسخة واحدة منه لإضفاء الصفة المحددة.

- **جين متنحي**: Recessive gene

هو الجين الذي يشفر عن صفة لا تظهر إلا إذا وجدت نسختان مـــن الجـــين، والعديد من الأمراض الوراثية تنشأ بسبب جينات متنحية.

- **جينات نف**: nif genes

مركب من الجينات ضروري من أجل تثبيت النتروجين، ولا تحمل جينات نـــف إلا عديمة التنوي التي تضم بكتيريا معينة والطحالب الخضراء والزرقاء، غير

أنه يمكن لبعض من هذه الكائنات العضوية أن تكون علاقات تكافلية حميمة مع النباتات الخضراء وخاصة البقوليات.

(ح)

- حامل المرض:Carrier

شخص يحمل ويستطيع أن ينقل جين مرض وراثي، لكنه لا يصاب بالمرض، وتسبب الجينات المتنحية العديد من الأمراض الوراثية،والتي يجب أن يـــورث منها نسختان حتى تحدث الإصابة؛وحامل المرض الذي لديه نسخة واحدة مـــن جين متنحي ،لا تظهر عليه أية أعراض للمرض.

- حلزون مزدوج: Double helix

التركيب الثلاثي الأبعاد للـــ د.ن.أ، الذي تلتف فيه جديلتي الجزيء معاً بشكل حلزوني منتظم.

- حماية متبادلة:Cross-protection

هي حالة تظهر عندما تصاب خلية من إحدى السلالات الفيروسية،فتحميها الإصابة بالعدوى من أن تصاب من سلالة فيروسية أخرى تنتمي لنفس نوع الفيروس.

- حمض أميني :Amino acid

جزيئات الوحدات البنائية،التي ترتبط ببعضها البعض لتكوين ببتيدات وبروتينات.

- **حمض دهني: Fatty acid**

أحماض عضوية توجد في الدهون، وأيضاً كوسائط في مسارات منتجة للطاقة مثل دورة الأحماض ثلاثية الكربوكسيل، وللأحماض الدهنية عدد من التطبيقات المتنوعة،فيمكن أن تستخدم على سبيل المثال، كعوامل مكسبة للنكهة وكمشحمات.

- **حمض الريبونكليك(ر.ن.أ) : Ribonucleic acid (RNA)**

أحد الحمضين النووين الرئيسين، ويشبه تركيب الـ ر.ن.أ تركيب الـ د.ن.أ، غير أنه يحتوي على ريبوز السكر بدلاً الريبوز المنقوص الأكسجين، ويشمل الـ ر.ن.أ على ر.ن.أ الرسول، والـ ر.ن.أ الريبوسومي، والـ ر.ن.أ الناقل.

- **حمض نووي: Nucleic acid**

جزيئات تتكون من عمود فقري من مجموعات السكر والفوسفات المتبادلة،التي تبرز منها بعض القواعد العضوية التي تتصل بمجموعات السكر، وسميت الأحماض النووية بذلك، لأنها كانت تعزل في الأصل من نوى الخلايا، وتشمل هذه الأحماض على الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين، الذي يشكل المادة الوراثية، والأحماض الريبية النووية.

(خ)

- **خريطة تحديد: Restriction mapping**

رسم خريطة لجزىء د.ن.أ عن طريق هضمه بإنزيمات القطع، وسوف يكون لكل جزئ د.ن.أ نمطه المميز من المراكز التي تتعرف عليها الإنزيمات، ويمكن

أن تستخدم الخرائط نتيجة لذلك في مقارنة قرابة جزيئات د.ن.أ من مصـــادر مختلفة،

- خلية :Cell

الوحدة الأساسية التي تتكون منها الكائنات العضوية الحية، وتتكــون بعــض الكائنات العضوية مثل البكتيريا من خلية واحدة فقط،في حين تتكــون بعــض الكائنات الأخرى كالإنسان من بلايين الخلايا.

- خلية جذعية: Stem cell

شكل غير ناضج من خلية نخاع العظم، وهي تنقسم لتكوين ذرية، يعمل البعض منها على البقاء على مجموعة الخلية الجذعية، بينما ينتج عن البعض الآخــر كل سلالات الخلايا الرئيسة التي تنشأ من نخاع العظم.

- خلية جسدية: Somatic cell

أي نوع من خلايا كائن عضوي ما عدا الخلايا الجرثومية

- خلية سوية التنوي: Eukaryote

أي كائن عضوي تكون فيه للخلايا نواة حقيقية محاطة بغشاء، وتعتبر الخلايا سليمة التنوي عادة شكلاً أكثر تطور من أشكال الحياة عن الخلايا بدائية التنوي.

- خلية لمفيةB : B lymphocyte

نوع من خلايا الدم البيضاء تنتج أجسام مضادة،عندما تنشط بصورة ملائمــة. وترمزB إلى كيس فابرسيوس bursa of fabricius،وهو العضو الذي تنضـــج

فيه الخلاياB داخل الدجاجة، ولا يزال العضو المشابه له في الثـديات غيـر معروف.

(د)

- د.ن.أ : DNA

انظر الحمض الريبي النووي المنقوص الأكسجين.

- د.ن.أ مطعم : Recombinant DNA

جزئ د.ن.أ يتكون من اتحاد قطع د.ن.أ من مصدرين أو أكثر.

- دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل:Tricarboxylic acid (TCA) cycle

أحد المسارات الرئيسة للأيض في الخليـة،وينتج عـن دورة حمـض ثلاثـي الكربوكسيل معظم الطاقة المنبعثة أثناء هدم السـكريات والـدهون، وسـميت الدورة بذلك نسبة إلى المركب الأول في المسار.

(ر)

- ركيزة: Substrate

مركب يؤثر عليه إنزيم، ومن ثم يحوله إلى مركب آخر.

- ر.ن.أ : RNA

انظر حمض الريبونكليك

- ر.ن.أ رسول: Messenger RNA (mRNA)

صورة من صور ر.ن.أ تنسخ من د.ن.أ الجينات، بحيث أن تركيبـه يحتـوي على "رسالة" مشفرة في الجين، ويحمل ر.ن.أ الرسول هـذه الرسـالة إلـى الريبوسومات حيث توجه تخليق البروتين.

- ر.ن.أ ريبوسومي: Ribosomal RNA (rRNA)

نوع من الـــ ر.ن.أ يجمع بين بروتينات عديدة لتكوين جسيمات ريباسية .

- ر.ن.أ ناقل: Transfer RNA (t RNA)

نوع من الـــ ر.ن.أ يلتقط الأحماض الأمينية وينقلها إلى الجسيمات الريباسـية حيث يتم تخليق البروتين، ويصفها في الوضع الصحيح على ر.ن.أ الرسـول، بحيث يمكن أن ترتبط ببعضها لتكوين بروتين.

- ريبوز منقوص الأكسجين :Deoxyribose

سكر موجود في الأحماض النووية،وخاصة في الأحمـاض الريبيـة النوويـة منقوصة الأكسجين.

(س)

- ستيرويد(شبيهات الكوليسترول): Steroid

عضو من فئة مركبات ذات تركيب رئيس،يحتوي على حلقة بها خمـس ذرات كربون، وثلاث حلقات بكل منها ست ذرات كربون، والكوليسترول هو ستيرويد مثل هرمونات الجنس الذكرية والأنثوية وبعض الهرمونات الأخرى التي تنظم توازن الملح والماء والأيض.

- سكر: Sugar •

شكل بسيط من الكربوهيدرات وعادة ما يكون حلو، وبعض أنواع السكر مثل الجلوكوز تعتبر مصادر طاقة للخلايا، وتعتبر أيضـاً وحـدات بنـاء لعديـدات سكريات، مثل النشا والسليلوز.

(ص)

- صبغة عادية :Autosome

أي كروموسوم غير الكروموسومات المحددة لجنس كائن عضوي، فالإنسان علي سبيل المثال، له ٤٦ كروموسوماً،اثنان منهما(كروموسومX وكروموسوم Y)،يحددان نوع الفرد،وبقية الكروموسومات تعتبر صبغيات عادية.

(ط)

- طافر: Mutant

كائن عضوي حدثت به بعض التغيرات بسبب طفر جيني.

(ع)

- عامل مساعد:Cofactor

جزيء صغير أساسي للنشاط الحفزي لإنزيم.

- عديد السكريات: Polysaccharide

مواد كربوهيدراتية كبيرة تتكون من وصل العديد من جزيئات السكر ببعضها، ومثال لذلك، النشا والسليلوز.

- علاج بالجين : Gene Therapy

علاج مرض وراثي بشري عن طريق إدخال جين جديد في المريض للقيام بوظيفة الجين المعيب الذي يسبب المرض.

- **عنصر انتقالي:** Transposable element

قطعة د.ن.أ يمكنها التحرك داخل مجموعة العوامل الوراثية، ويمكنها أن تحدث طفرات إذا دخلت جين، والعناصر الانتقالية التي تسمى أيضاً ترانسبوزونات يجري اختبارها حالياً كمتجهات محتملة لنقل الجين.

(غ)

- **غسل حيوي:** Bioleaching

استخدام المحاليل المحتوية على البكتيريا لإذابة واستخلاص معادن نفيسة من الخامات.

(ف)

- **فتل خيطي(ميتاكوندريا):** Mitochondrion

جسيم محاط بغشاء،يعتبر مركز التفاعلات الرئيسة المنتجة للطاقة في الخلية،التي تشمل على دورة حمض ثلاثي الكربوكسيل.

- **فحص عينة حية من الزغبات المشيمية:** Chorionic villus biopsy

هو إجراء يتم من خلاله إزالة عينة صغيرة من نسيج الزغب (الزغب أحد أغشية الجنين)،وفحصها للكشف عن التشوهات الجنينية،وخاصة تلك التشوهات الناشئة عن مصدر وراثي.

- **فقر الدم البحري:** Thalassaemia

نوع من أنيميا الوراثة الذي يسبب فيه جين معيب نقصان أو غياب كامل لأحد بروتيني جزىء الهيموجلوبين.

- فيروس: Virus

جسيمات تتكون من لب حمض نووي، التـــي إمـــا أن تكـــون د.ن.أ أو ر.ن.أ محاطة بغلاف بروتيني، والفيروسات هي طفيليات تتناسل بـــدخولها الخلايـــا وتقوم بالآلية التخليقية للخلايا.

- فيروس رجعي: Retrovirus

أية مجموعة من الفيروسات تكون مادتها الوراثية هي الـــ ر.ن.أ بدلاً من الـــ د.ن.أ،وتشمل دورات حياتها على خطوة ينسخ فيها الـــ ر.ن.أ الفيروسي فـــي الـــ د.ن.أ.

- فيروس عصوي :Baculovirus

نوع من الفيروسات يصيب الحشرات ويستخدم كمبيد بيولوجي حشري.

(ك)

- كائن ممرض: Pathogen

أي كائن مجهري أو فيروس يسبب مرض.

- كالوس :Callus

كتلة من الخلايا غير متميزة تتكون على جروح النبات،وتنتجها أيضاً الأنسجة النباتية النامية في مزارع الخلية النباتية.

- كربوهيدرات:Carbohydrate

مركبات بيولوجية تحتوي على الكربون والهيدروجين والأكسجين،وعادة ما ترتبط ذرة الكربون بذرتين من الهيدروجين وذرة واحدة من الأكسجين،

وتشمل الكربوهيدرات السكريات البسيطة مثل الجلوكوز والجزيئات الأكثر تعقيداً،مثل النشا والسليلوز،التي تتحد فيها العديد من السكريات لتكوين بوليمرات كبيرة.

- كروماتين :Chromatin

مركب من البروتين والـــ د.ن.أ،تتكون منه الكروموسومات.

- كروموسومات:Chromosomes

تركيبات شبيهة بالخيوط في نواة الخلية،تحتوي على الجينات في مصفوفة طولية،وتحتوي كل خلية جسدية من الخلايا سليمة التنوي على مجموعة مزدوجة من الكروموسومات.

- كودون: Codon

تسلسل من ثلاث نكليوتيدات متتالية،يوجد في الـــ د.ن.أ أو الـــ ر.ن.أ،والتي إما أن يحدد حمضاً أمينياً واحداً في بروتين أو يستخدم كعلامة إشارة توقيف في نهاية جين.

(ل)

- لاقحة مختلفة الصبغيات : Heterozygote

تورث الجينات في صورة أزواج،يأتي أحد الزوجين من الأم والآخر من الأب، والفرد متباين اللواقح هو الشخص الذي يتكون فيه زوج اللواقح من نـــوعين مختلفين من جين معين، فجين جلوبين بيتا، على ســبيل المثـــال، يمكــن أن يتزاوج مع جين خلية منجلية.

- لاقحة متجانسة الصبغيات: Homozygote

هو الشخص الذي تكون لديه نسختا زوج جين معين متماثلتان.

- لقاح: Vaccine

مستحضر يدخل في الجسم لتحفيز المناعة ضد كائن ممرض، عادة ما يكـون فيروس أو بكتيريا، وتصنع معظم اللقاحات من الكائن الممرض نفسه، الـذي إما أن يكون ميتاً أو موهناً، بحيث لا يمكنه أن يحدث المرض.

(م)

- متجه: Vector

في التكنولوجيا الحيوية، جزىء د.ن.أ يكون عادة بلازميد أو د.ن.أ فيروسي، يستخدم لنقل الجينات إلى الخلايا.

- مختلف الاغتذاء : Heterotroph

كائن عضوي لا يستطيع أن ينم على ثاني أكسيد الكربـون، ولكـن يجـب أن يحصل على مصادر كربونية أكثر تعقداً مثل السكريات.

- متماثلات الصورة :Enantiomers

مركبات تعتبر صور مرآوية من بعضها البعض، ويمكن أن توجد في مركب ترتبط فيه أربع مجموعات بديلة مختلفة بنفس ذرة الكربون.

- مثال التولد: Idiotype

موقع مميز لجسم مضاد معين،فمثال التولد الذي يقع بداخل أو بـالقرب مـن مركز ارتباط مستضد لجسم مضاد،يمكنه أن يحفز بنفسه إنتاج الجسم المضاد

وقد يكون له شكل متمم لشكل المستضد الذي يتعرف عليـه الجسـم المضـاد ويرتبط به.

مجموعة العوامل الوراثية: Genome

التركيب الجيني الكامل لكائن عضوي.

- محرض: Promoter

تسلسل د.ن.أ منظم يكون مقترناً بجين، وهو ضروري من أجل البدء الـدقيق لنسخ جين.

- مخمر: Fermentor

الخزان أو أي جهاز آخر تتم فيه تفاعلات التخمير، وعادة ما يـزود المخمـر بوسائل لمراقبة وضبط حالات التفاعل التي تتم بداخله.

- مرض رفض الطعم للعائل : Graft-versus-host disease

حالة تحدث للأشخاص الذين يجرون عمليات زرع نخاع العظم، ويسببه النخاع المنقول(الطعم) منتجا خلايا مناعية تقوم بمهاجمة أنسجة المريض وتعتبرهـا أنسجة غريبة.

- مرض ليسك-نيهان: Lesch-Nyhan disease

مرض وراثي يسببه جين معيب لإنزيم هيبوكسانثين-جوانين فسفوريبوسـيل ترنسفيراز(HPRT)، وتتصف الحالة بتركيزات متزايدة من حمض البوليك في الدم، وأعراض عصبية تشتمل على تخلف عقلي وإجبار المريض على جـدع نفسه.

- مرض مورث: Hereditary disease

مرض يمكن أن ينتقل من جيل لجيل آخر ويكون بسبب جين معيب.

- مرض وراثي: Genetic disease

مرض يسببه جين معيب، ويمكن أن ينتقل من جيل لجيل.

- مزرعة:Culture

انظر مزرعة الخلية.

- مزرعة الخلية:Cell culture

خلايا أو أنسجة نامية على مادة غذائية معينة في أطباق المعمل.

- مستقبل: Receptor

جزىء يكون عادة بروتين، يوجد على الغشاء الخارجي للخلية، ويتعرف المستقبل ويرتبط برسول ضمنخلوي محدد، مثل هرمون أو عامل نمو، ومن ثم يبدأ في إحداث تأثيرات الرسول داخل الخلية.

- مستنسخ :Clone

مجموعة من الخلايا المتماثلة جينياً أو الكائنات العضوية التي تنحدر جميعها بطريقة غير جنسية من نفس الفرد.(انظر أيضاً استنساخ الجين).

- مضاد حيوي:Antibiotic

أي مجموعة من مواد كيميائية متنوعة من حيث التركيب،تنتجها كائنات مجهرية تشمل على البكتيريا والفطريات،التي تقتل الكائنات المجهرية الأخرى،

وتستخدم المضادات الحيوية في علاج الأمراض البكتيرية،وثبتت فاعلية بعض المضادات الحيوية في العلاج الكيماوي للسرطان.

- معزز: Enhancer

تسلسل د.ن.أ منظم يرتبط بجين، ويعمل على زيادة نسخ هذا الجين في ر.ن.أ الرسول.

- مغتذ ذاتي :Autotroph

كائن عضوي يمكنه النمو على ثاني أكسيد الكربون،كمصدره الوحيد من الكربون.

- مفاعل حيوي:Bioreactor

عبارة عن وعاء كبير أو خزان تتم فيه عملية التخمـــر، وتـــزود المفـــاعلات الحيوية بعدة أجهزة لمراقبة وضبط التفاعلات في الخزان،بحيث يتم التفاعـــل بصورة فعالة.

- مكتبة جينية: Gene library

مجموعة من مستنسخات خلوية، عادة ما تكون حاليا خلايا بكتيرية، يحتـــوي كل منها قطعة د.ن.أ من مصدر معين، وتتكون المكتبة الجينية، على ســـبيل المثال، من مستنسخات خلوية تحتوي على قطع من د.ن.أ بشري.

- منشط نسيج مولد البلازمين: Tissue plasminogen activator(TPA)

هو إنزيم يحول نذير مولد بلازمين الخامل إلى مولد بلازمين إنزيم نشط، يعمل على إذابة جلطات الدم، والـــ TPA التي تصنع بواسطة تكنولوجيا الـــــ د.ن.أ

المطعم يجري اختبارها إكلينيكياً لاستخدامها في إذابة جلطات الدم المتكونة في الشرايين التاجية في المصابين بالنوبات القلبية.

- مواد أولية كيميائية: Feedstock chemicals
مواد كيميائية تستخدم بكميات كبيرة كمواد بادئة لتصنيع مواد كيميائية أخرى.

- مولد المضاد(مستضد) :Antigen
هو بالتحديد،أي جزيء يتعرف على جسم مضاد ويرتبط به،وعادة ما يكون هذا الجزيء المستخدم في إثارة إنتاج الجسم المضاد.

- مولد ورم: Oncogene
جين يمكنه أن يجعل الخلايا تصاب بتحول سرطاني، وتعتبر مولدات الورم صور شاذة من الجينات الخلوية الطبيعية اللازمة للنمو والتمايز.

(ن)

- نبات ثنائي الفلقة:Dicotyledonous plant
إحدى الرتبتين تحت الفرعيتين الرئيسيتين، وتحتوي أجنة النباتات ثنائية الفلقة على أوراق ذات فلقتين. ومن النباتات ثنائية الفلقة: الأشجار والشجيرات والعديد من المحاصيل النباتية المعروفة مثل الطماطم والبطاطس والتبغ.

- نبات وحيد الفلقة: Monocotyledonous plant(monocot)
أحد رتبتين كبيرتين من النباتات، وللنباتات وحيدة الفلقة أجنة ذات ورقة بزرية واحدة(ورقة جنينية ترافق بزور الزهريات)، وينتمي إلى هذه الرتبة النجيليات ومحاصيل الحبوب الرئيسة والقمح والذرة والأرز. (انظر أيضاً ثنائية الفلقة).

- نتروجيناز: Nitrogenase

مركب إنزيمي يقوم باختزال النتروجين الجوي إلى أمونيا أثناء التثبيت البيولوجي للنتروجين.

- نسخ: Transcription

نسخ الجينات من د.ن.أ في ر.ن.أ الرسول، الذي يعتبر الخطوة الأولى في تعبير الجين.

- نشوء: Evolution

تطور أشكال جديدة للحياة من أنواع سابقة الوجود.

- نقص إنزيم أدينوزين دياميناز : Adenosine deaminase deficiency

مرض وراثي، يتسبب عن نقص إنزيم أدينوزين ديامينار ويؤدي إلى فقد شديد في الاستجابة المناعية التي عادة ما تكون مميتة في السنوات القلائل الأولي من العمر، ويحتمل أن يكون هذا المرض من الأمراض المرشحة للمحاولات الأولى العلاج بالجين.

- نكليوتيد: Nucleotide

جزىء يتكون من سكر مرتبط به مجموعة فوسفات وقاعدة عضوية، وتعتبر النكليوتيدات وحدات بناء الأحماض النووية.

- نواة: Nucleus

التركيب الأكثر وضوحاً داخل خلية سليمات التنوي،وتحاط النواة بغشاء وتحتوي على الكروموسومات.

(هـ)

- هجين خلية جسدية:Somatic cell hybrid

هجين ينتج عن دمج خلايا جسدية من نوعين مختلفين، وخاصة من الأنـواع النباتية.

- هرمون: Hormone

مادة نشطة بيولوجيا، تنتج من أحد أجزاء الجسم ويحملها الدم إلى جزء آخـر حيث تحدث فيه تأثيراتها.

- هندسة وراثية: Genetic engineering

استخدام طرق الـ د.ن.أ المطعم لإضفاء صفات جديدة على الكائنات العضوية، عن طريق إدخال جينات جديدة في خلاياها.

- هيموجلوبين: Haemoglobin

الجزيء الحامل للأكسجين في خلايا الدم الحمراء، يتكون الهيموجلوبين مـن أربع سلاسل بروتينية: اثنتان كل منها بروتين جلوبين ألفا، واثنتان كل منهـا بروتين جلوبين بيتا، بالإضافة إلى صبغة الهيم الملونة للدم.

- هيموجلوبين بقولي: Leghaemoglobin

نوع من الهيموجلوبين يوجد في العقد المثبتة للنتروجين على جذور النباتـات البقولية، ويرتبط الهيموجلوبين البقولي بشدة بالأكسـجين، وإلا فإنـه يسـمم الإنزيمات المثبتة للنتروجين.

(و)

- ورم نخاعي: Mycloma

ورم الخلايا اللمفيةB المنتجة للجسم المضاد، وتستخدم خلايا الورم النخـاعي في صنع ورم الهجين لإنتاج الأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

- ورم هجين: Hybridoma

تصنع الخلية المهجنة بدمج خلية لمفيةB منتجة للجسم المضاد مع خلية ورم نخاعي، وتعد أورام الهجين مصدراً للأجسام المضادة أحادية الاستنساخ.

المؤلفون المشاركون في الكتاب

ألان أكياما **Alan Akiyama**

قسم الكيمياء،جامعة هارفارد .

تمر بركاى **Tamar Barkay**

وكالة حماية البيئة/الولايات المتحدة معمل الأبحاث البيئية بالولايات المتحدة.

ال و.بوركوين **Al W. Bourquin**

وكالة حماية البيئة/ معمل أبحاث البيئة بالولايات المتحدة.

ديب شاترجى **Deb Chatterjee**

قسم النبات،جامعة نوتنجهام بالمملكة المتحدة.

ستيفن كوسكى **Stephen Cuskey**

وكالة حماية البيئة/ معمل الأبحاث البيئية بالولايات المتحدة.

روبرت ت.فرالى **Robert T. Fraley**

شركة موسانتو، سانت لويس،ميسورى بالولايات المتحدة.

ل.بازيك جاج **L. Patrick Gage**

هوفمان–لا روش،نتلى،نيوجرسى بالولايات المتحدة

فريد جينثرين Fred Genthren

وكالة حماية البيئة، معمــل الأبحــاث البيئية،فلوريـــدا بالولايات المتحدة.

بورنو جرونبورن Bruno Gronenborn

معهد ماكس بلانك ،جمهورية ألمانيا الفيدرالية

رالف هاردى Ralph Hardy

مؤسسة بيوتكنيكا إنترناشيونال بالولايات المتحدة.

راندولف ت.هاتش Randolph T. Hatch

مؤسسة بيوتكنيكا إنترناشيونال،الولايات المتحدة

أندروب.ب.جونسون Andrew W.B.Johnston

معهد جون أنس،المملكة المتحدة

ريتشاردأ.لرنر Richard A. Lerner

معهد أبحاث سكربس كلينــك ،كاليفورنيــا ،الولايـــات المتحدة

جون هـــ.ليتشفيلد John H. Litchfield

معامل كولومبس بالولايات المتحدة

جين ل.ماركس Jean L. Marx

أخبار الأبحاث والعلوم ،واشنطن دى سى بالولايـــات المتحدة

سول ل.نيدمان Saul L. Neidleman

مؤسسة سيتوس،كاليفورنيا ،الولايات المتحدة

جوزيف ج.بربتش Jozeph G. Perpich

معهد هوارد هوجز الطبى ،مريلاند ،الولايات المتحدة

دوجلاس إ.راولنج Douglas E. Rawling

قسم الميكروبولجى،جامعة كيب تاون، ،جنوب أفريقيا

جوزيف سكل Jozeph Schell

معهد ماكس بلانك ،جمهورية ألمانيا الفيدرالية

توماس م.شنّك Tomas M. Shinnick

معمــــل أمـــراض هـــازنز،مراكز مراقبـــة الأمراض،أتلانتا،جورجيا بالولايات المتحدة

إيثان س.سيمون Ethan S. Simon

قسم الكيمياء،جامعـــة هارفارد،كمبردج،ماساشوســتس ،الولايات المتحدة

رونالد والتر Ronald Walter

وكالة حماية البيئة، معمل الأبحاث البيئيـــة بالولايـــات المتحدة

جورج وايتايدز George Whitesides

قسم الكيمياء،جامعة هارفارد ،كمبردج،ماساشوستس ،الولايات المتحدة

ديفيد وودز David Woods

قسم الميكروبولجى،مبنى البيولوجيا الجزيئية ،جامعة كيب تاون جنوب أفريقيا

بيت واى كان Yuet Wai Kan

قسم الطب والمعهد هوارد هجز الطبى،جامعة كاليفورنيا،سان فرانسيسكو،كاليفورنيا ،الولايات المتحدة

التعريـــف بالمترجـــم

هاشم أحمد محمد : حصل على بكالوريوس الهندسة المدنية عام ١٩٧٥.

صدر له عدة كتب منها :

١.قراءة فى مستقبل العالم ، وفاز بجائزة السيدة سوزان مبارك سنه ١٩٩٦.

٢. معجم التكنولوجيا الحيوية ،من سلسلة الألف كتاب الثانية سنة ١٩٩٦

٣. موسوعة كنوز المعرفة فى أسئلة وأجوبة ، من سلســلة العلــم والحيــاة الهيئة العامة للكتاب سنة ١٩٩٨.

٤.ترجمة كتاب حروب المياه ضمن المشروع القومى للترجمة ــ المجلــس الأعلى للثقافة .

٥.ترجمة القوى الأساسية الأربع فى الكون ، ضـــمن المشـــروع القـــومى للترجمة ـ المجلس الأعلى للثقافة .

٦.شارك فى ترجمة موسوعة الطفل التى أصدرتها الهيئة العامة للكتاب سنة ١٩٩٩

المراجع:

د.إبراهيم عبد المقصود إبراهيم ،تخرج فى كلية زراعة عين شمس عام ١٩٧٠، وحصل على درجة الدكتوراه فى الكيمياء الحيوية عام ١٩٨٦،ويعمل حالياً رئيس نشاط زراعة الأنسجة بمشروع مصر-كاليفورنيا بكلية زراعة جامعة القاهرة،ومشرف على معامل زراعة الأنسجة النباتية بوزارة الزراعة.

المحتويات

المشروع القومى للترجمة

المشروع القومى للترجمة مشروع تنمية ثقافية بالدرجة الأولى ، ينطلق من الإيجابيات التى حققتها مشروعات الترجمة التى سبقته فى مصر والعالم العربى ويسعى إلى الإضافة بما يفتح الأفق على وعود المستقبل، معتمداً المبادئ التالية :

١- الخروج من أسر المركزية الأوروبية وهيمنة اللغتين الإنجليزية والفرنسية .

٢- التوازن بين المعارف الإنسانية فى المجالات العلمية والفنية والفكرية والإبداعية .

٣- الانحياز إلى كل ما يؤسس لأفكار التقدم وحضور العلم وإشاعة العقلانية والتشجيع على التجريب .

٤- ترجمة الأصول المعرفية التى أصبحت أقرب إلى الإطار المرجعى فى الثقافة الإنسانية المعاصرة، جنباً إلى جنب المنجزات الجديدة التى تضع القارئ فى القلب من حركة الإبداع والفكر العالميين .

٥- العمل على إعداد جيل جديد من المترجمين المتخصصين عن طريق ورش العمل بالتنسيق مع لجنة الترجمة بالمجلس الأعلى للثقافة .

٦- الاستعانة بكل الخبرات العربية وتنسيق الجهود مع المؤسسات المعنية بالترجمة .

المشروع القومى للترجمة

١-	اللغة العليا	جون كوين	أحمد درويش
٢-	الوثنية والإسلام (ط١)	ك. مادهو بانيكار	أحمد فؤاد بلبع
٣-	التراث المسروق	جورج جيمس	شوقى جلال
٤-	كيف تتم كتابة السيناريو	انجا كاريتنيكوفا	أحمد الحضرى
٥-	ثريا فى غيبوبة	إسماعيل فصيح	محمد علاء الدين منصور
٦-	اتجاهات البحث اللسانى	ميلكا إفيتش	سعد مصلوح ووفاء كامل فايد
٧-	العلوم الإنسانية والفلسفة	لوسيان غولدمان	يوسف الأنطكى
٨-	مشعلو الحرائق	ماكس فريش	مصطفى ماهر
٩-	التغيرات البيئية	أندرو. س. جودى	محمود محمد عاشور
١٠-	خطاب الحكاية	چيرار چينيت	محمد معتصم وعبد الجليل الأزدى وعمر حلى
١١-	مختارات شعرية	فيسوافا شيمبوريسكا	هناء عبد الفتاح
١٢-	طريق الحرير	ديفيد براونيستون وأيرين فرانك	أحمد محمود
١٣-	ديانة الساميين	روبرتسن سميث	عبد الوهاب علوب
١٤-	التحليل النفسى للأدب	جان بيلمان نويل	حسن المودن
١٥-	الحركات الفنية منذ ١٩٤٥	إدوارد لوسى سميث	أشرف رفيق عفيفى
١٦-	أثينة السوداء (جـ١)	مارتن برنال	بإشراف: أحمد عتمان
١٧-	مختارات شعرية	فيليب لاركين	محمد مصطفى بدوى
١٨-	الشعر النسائى فى أمريكا اللاتينية	مختارات	طلعت شاهين
١٩-	الأعمال الشعرية الكاملة	چورج سفيريس	نعيم عطية
٢٠-	قصة العلم	ج. ج. كراوثر	يمنى طريف الخولى و بدوى عبد الفتاح
٢١-	خوخة وألف خوخة وقصص أخرى	صمد بهرنجى	ماجدة العنانى
٢٢-	مذكرات رحالة عن المصريين	جون أنتيس	سيد أحمد على الناصرى
٢٣-	تجلى الجميل	هانز جيورج جادامر	سعيد توفيق
٢٤-	ظلال المستقبل	باتريك بارندر	بكر عباس
٢٥-	مثنوى	مولانا جلال الدين الرومى	إبراهيم الدسوقى شتا
٢٦-	دين مصر العام	محمد حسين هيكل	أحمد محمد حسين هيكل
٢٧-	التنوع البشرى الخلاق	مجموعة من المؤلفين	بإشراف: جابر عصفور
٢٨-	رسالة فى التسامح	جون لوك	منى أبو سنة
٢٩-	الموت والوجود	جيمس ب. كارس	بدر الديب
٣٠-	الوثنية والإسلام (ط٢)	ك. مادهو بانيكار	أحمد فؤاد بلبع
٣١-	مصادر دراسة التاريخ الإسلامى	جان سوفاجيه - كلود كاين	عبد الستار الحلوجى وعبد الوهاب علوب
٣٢-	الانقراض	ديفيد روب	مصطفى إبراهيم فهمى
٣٣-	التاريخ الاقتصادى لأفريقيا الغربية	أ. ج. هوبكنز	أحمد فؤاد بلبع
٣٤-	الرواية العربية	روجر ألن	حصة إبراهيم المنيف
٣٥-	الأسطورة والحداثة	پول ب . ديكسون	خليل كلفت
٣٦-	نظريات السرد الحديثة	والاس مارتن	حياة جاسم محمد

٣٧-	واحة سيوة وموسيقاها	بريجيت شيفر	جمال عبد الرحيم
٣٨-	نقد الحداثة	آلن تورين	أنور مغيث
٣٩-	الحسد والإغريق	بيتر والكوت	منيرة كروان
٤٠-	قصائد حب	آن سكستون	محمد عيد إبراهيم
٤١-	ما بعد المركزية الأوروبية	بيتر جران	عاطف أحمد وإبراهيم فتحى ومحمود ماجد
٤٢-	عالم ماك	بنجامين باربر	أحمد محمود
٤٣-	اللهب المزدوج	أوكتافيو باث	المهدى أخريف
٤٤-	بعد عدة أصياف	ألدوس هكسلى	مارلين تادرس
٤٥-	التراث المغدور	روبرت دينا وجون فاين	أحمد محمود
٤٦-	عشرون قصيدة حب	بابلو نيرودا	محمود السيد على
٤٧-	تاريخ النقد الأدبى الحديث (جـ١)	رينيه ويليك	مجاهد عبد المنعم مجاهد
٤٨-	حضارة مصر الفرعونية	فرانسوا دوما	ماهر جويجاتى
٤٩-	الإسلام فى البلقان	هـ . ت . نوريس	عبد الوهاب علوب
٥٠-	ألف ليلة وليلة أو القول الأسير	جمال الدين بن الشيخ	محمد برادة وعثمانى الميلود ويوسف الأنطكى
٥١-	مسار الرواية الإسبانو أمريكية	داريو بيانويبا وخ. م. بينياليستى	محمد أبو العطا
٥٢-	العلاج النفسى التدعيمى	ب. نوفاليس وس . روجسيفيتز وروجر بيل	لطفى فطيم وعادل دمرداش
٥٣-	الدراما والتعليم	أ . ف . ألنجتون	مرسى سعد الدين
٥٤-	المفهوم الإغريقى للمسرح	ج . مايكل والتون	محسن مصيلحى
٥٥-	ما وراء العلم	چون بولكنجهوم	على يوسف على
٥٦-	الأعمال الشعرية الكاملة (جـ١)	فديريكو غرسية لوركا	محمود على مكى
٥٧-	الأعمال الشعرية الكاملة (جـ٢)	فديريكو غرسية لوركا	محمود السيد و ماهر البطوطى
٥٨-	مسرحيتان	فديريكو غرسية لوركا	محمد أبو العطا
٥٩-	المحبرة (مسرحية)	كارلوس مونييث	السيد السيد سهيم
٦٠-	التصميم والشكل	جوهانز إيتين	صبرى محمد عبد الغنى
٦١-	موسوعة علم الإنسان	شارلوت سيمور - سميث	بإشراف : محمد الجوهرى
٦٢-	لذّة النّص	رولان بارت	محمد خير البقاعى
٦٣-	تاريخ النقد الأدبى الحديث (جـ٢)	رينيه ويليك	مجاهد عبد المنعم مجاهد
٦٤-	برتراند راسل (سيرة حياة)	آلان وود	رمسيس عوض
٦٥-	فى مدح الكسل ومقالات أخرى	برتراند راسل	رمسيس عوض
٦٦-	خمس مسرحيات أندلسية	أنطونيو جالا	عبد اللطيف عبد الحليم
٦٧-	مختارات شعرية	فرناندو بيسوا	المهدى أخريف
٦٨-	نتاشا العجوز وقصص أخرى	فالنتين راسبوتين	أشرف الصباغ
٦٩-	العالم الإسلامى فى أوائل القرن العشرين	عبد الرشيد إبراهيم	أحمد فؤاد متولى وهويدا محمد فهمى
٧٠-	ثقافة وحضارة أمريكا اللاتينية	أوخينيو تشانج رودريجث	عبد الحميد غلاب وأحمد حشاد
٧١-	السيدة لا تصلح إلا للرمى	داريو فو	حسين محمود
٧٢-	السياسى العجوز	ت . س . إليوت	فؤاد مجلى
٧٣-	نقد استجابة القارئ	چين ب . تومبكنز	حسن ناظم وعلى حاكم
٧٤-	صلاح الدين والمماليك فى مصر	ل . ا . سيمينوڤا	حسن بيومى

٧٥-	فن التراجم والسير الذاتية	أندريه موروا	أحمد درويش
٧٦-	چاك لاكان وإغواء التحليل النفسى	مجموعة من المؤلفين	عبد المقصود عبد الكريم
٧٧-	تاريخ النقد الأدبى الحديث (جـ٣)	رينيه ويليك	مجاهد عبد المنعم مجاهد
٧٨-	العولمة : النظرية الاجتماعية والثقافة الكونية	رونالد روبرتسون	أحمد محمود ونورا أمين
٧٩-	شعرية التأليف	بوريس أوسبنسكى	سعيد الغانمى وناصر حلاوى
٨٠-	بوشكين عند «نافورة الدموع»	ألكسندر بوشكين	مكارم الغمرى
٨١-	الجماعات المتخيلة	بندكت أندرسن	محمد طارق الشرقاوى
٨٢-	مسرح ميجيل	ميجيل دى أونامونو	محمود السيد على
٨٣-	مختارات شعرية	غوتفريد بن	خالد المعالى
٨٤-	موسوعة الأدب والنقد (جـ١)	مجموعة من المؤلفين	عبد الحميد شيحة
٨٥-	منصور الحلاج (مسرحية)	صلاح زكى أقطاى	عبد الرازق بركات
٨٦-	طول الليل (رواية)	جمال مير صادقى	أحمد فتحى يوسف شتا
٨٧-	نون والقلم (رواية)	جلال آل أحمد	ماجدة العنانى
٨٨-	الابتلاء بالتغرب	جلال آل أحمد	إبراهيم الدسوقى شتا
٨٩-	الطريق الثالث	أنتونى جيدنز	أحمد زايد ومحمد محيى الدين
٩٠-	وسم السيف وقصص أخرى	بورخيس وآخرون	محمد إبراهيم مبروك
٩١-	المسرح والتجريب بين النظرية والتطبيق	باربرا لاسوتسكا - بشونباك	محمد هناء عبد الفتاح
٩٢-	أساليب ومضامين المسرح الإسبانوأمريكى المعاصر	كارلوس ميجيل	نادية جمال الدين
٩٣-	محدثات العولمة	مايك فيذرستون وسكوت لاش	عبد الوهاب علوب
٩٤-	مسرحيتا الحب الأول والصحبة	صمويل بيكيت	فوزية العشماوى
٩٥-	مختارات من المسرح الإسبانى	أنطونيو بويرو باييخو	سرى محمد عبد اللطيف
٩٦-	ثلاث زنبقات ووردة وقصص أخرى	نخبة	إدوار الخراط
٩٧-	هوية فرنسا (مج١)	فرنان برودل	بشير السباعى
٩٨-	الهم الإنسانى والابتزاز الصهيونى	مجموعة من المؤلفين	أشرف الصباغ
٩٩-	تاريخ السينما العالمية (١٨٩٥-١٩٨٠)	ديڤيد روبنسون	إبراهيم قنديل
١٠٠-	مساءلة العولمة	بول هيرست وجراهام تومبسون	إبراهيم فتحى
١٠١-	النص الروائى: تقنيات ومناهج	بيرنار فاليط	رشيد بنحدو
١٠٢-	السياسة والتسامح	عبد الكبير الخطيبى	عز الدين الكتانى الإدريسى
١٠٣-	قبر ابن عربى يليه آياء (شعر)	عبد الوهاب المؤدب	محمد بنيس
١٠٤-	أوبرا ماهوجنى (مسرحية)	برتولت بريشت	عبد الغفار مكاوى
١٠٥-	مدخل إلى النص الجامع	چيرارچينيت	عبد العزيز شبيل
١٠٦-	الأدب الأندلسى	ماريا خيسوس روبييرامتى	أشرف على دعدور
١٠٧-	صورة الفدائى فى الشعر الأمريكى اللاتينى المعاصر	نخبة من الشعراء	محمد عبد الله الجعيدى
١٠٨-	ثلاث دراسات عن الشعر الأندلسى	مجموعة من المؤلفين	محمود على مكى
١٠٩-	حروب المياه	چون بولوك وعادل درويش	هاشم أحمد محمد
١١٠-	النساء فى العالم النامى	حسنة بيجوم	منى قطان
١١١-	المرأة والجريمة	فرانسس هيدسون	ريهام حسين إبراهيم
١١٢-	الاحتجاج الهادئ	أرلين علوى ماكليود	إكرام يوسف

العنوان	المؤلف	المترجم
١١٣- راية التمرد	سادى پلانت	أحمد حسان
١١٤- مسرحيتا حصاد كونجى وسكان المستنقع	وول شوينكا	نسيم مجلى
١١٥- غرفة تخص المرء وحده	فرچينيا وولف	سمية رمضان
١١٦- امرأة مختلفة (درية شفيق)	سينثيا نلسون	نهاد أحمد سالم
١١٧- المرأة والجنوسة في الإسلام	ليلى أحمد	منى إبراهيم وهالة كمال
١١٨- النهضة النسائية في مصر	بث بارون	لميس النقاش
١١٩- النساء والأسرة وقوانين الطلاق في التاريخ الإسلامي	أميرة الأزهرى سنبل	بإشراف: رءوف عباس
١٢٠- الحركة النسائية والتطور في الشرق الأوسط	ليلى أبو لغد	مجموعة من المترجمين
١٢١- الدليل الصغير في كتابة المرأة العربية	فاطمة موسى	محمد الجندى وإيزابيل كمال
١٢٢- نظام العبودية القديم والنموذج المثالي للإنسان	جوزيف فوجت	منيرة كروان
١٢٣- الإمبراطورية العثمانية وعلاقاتها الدولية	أنينل ألكسندرو فنادولينا	أنور محمد إبراهيم
١٢٤- الفجر الكاذب: أوهام الرأسمالية العالمية	چون جراى	أحمد فؤاد بلبع
١٢٥- التحليل الموسيقى	سيدرك ثورپ ديڤى	سمحة الخولى
١٢٦- فعل القراءة	ڤولڤانج إيسر	عبد الوهاب علوب
١٢٧- إرهاب (مسرحية)	صفاء فتحى	بشير السباعى
١٢٨- الأدب المقارن	سوزان باسنيت	أميرة حسن نويرة
١٢٩- الرواية الإسبانية المعاصرة	ماريا دولورس أسيس جاروته	محمد أبو العطا وآخرون
١٣٠- الشرق يصعد ثانية	أندريه جوندر فرانك	شوقى جلال
١٣١- مصر القديمة: التاريخ الاجتماعى	مجموعة من المؤلفين	لويس بقطر
١٣٢- ثقافة العولمة	مايك فيذرستون	عبد الوهاب علوب
١٣٣- الخوف من المرايا (رواية)	طارق على	طلعت الشايب
١٣٤- تشريح حضارة	بارى ج. كيمب	أحمد محمود
١٣٥- المختار من نقد ت. س. إليوت	ت. س. إليوت	ماهر شفيق فريد
١٣٦- فلاحو الباشا	كينيث كونو	سحر توفيق
١٣٧- مذكرات ضابط في الحملة الفرنسية على مصر	چوزيف مارى مواريه	كاميليا صبحى
١٣٨- عالم التليفزيون بين الجمال والعنف	أندريه جلوكسمان	وجيه سمعان عبد المسيح
١٣٩- پارسيڤال (مسرحية)	ريتشارد ڤاجنر	مصطفى ماهر
١٤٠- حيث تلتقى الأنهار	هربرت ميسن	أمل الجبورى
١٤١- اثنتا عشرة مسرحية يونانية	مجموعة من المؤلفين	نعيم عطية
١٤٢- الإسكندرية : تاريخ ودليل	أ. م. فورستر	حسن بيومى
١٤٣- قضايا التنظير في البحث الاجتماعى	ديرك لايدر	عدلى السمرى
١٤٤- صاحبة اللوكاندة (مسرحية)	كارلو جولدونى	سلامة محمد سليمان
١٤٥- موت أرتيميو كروث (رواية)	كارلوس فوينتس	أحمد حسان
١٤٦- الورقة الحمراء (رواية)	ميجيل دى ليبس	على عبدالروف البمبى
١٤٧- مسرحيتان	تانكريد دورست	عبدالغفار مكاوى
١٤٨- القصة القصيرة: النظرية والتقنية	إنريكى أندرسون إمبرت	[illegible] إبراهيم منوفى
١٤٩- النظرية الشعرية عند إليوت وأدونيس	عاطف فضول	أسا[illegible]بر
١٥٠- التجربة الإغريقية	روبرت ج. ليتمان	منيرة كروان

١٥١- هوية فرنسا (مج ٢ ، جـ١)	فرنان برودل	بشير السباعى
١٥٢- عدالة الهنود وقصص أخرى	مجموعة من المؤلفين	محمد محمد الخطابى
١٥٣- غرام الفراعنة	فيولين فانويك	فاطمة عبدالله محمود
١٥٤- مدرسة فرانكفورت	فيل سليتر	خليل كلفت
١٥٥- الشعر الأمريكى المعاصر	نخبة من الشعراء	أحمد مرسى
١٥٦- المدارس الجمالية الكبرى	جى أنبال وآلان وأوديت ڤيرمو	مى التلمسانى
١٥٧- خسرو وشيرين	النظامى الكنجوى	عبدالعزيز بقوش
١٥٨- هوية فرنسا (مج ٢ ، جـ٢)	فرنان برودل	بشير السباعى
١٥٩- الأيديولوجية	ديفيد هوكس	إبراهيم فتحى
١٦٠- آلة الطبيعة	بول إيرليش	حسين بيومى
١٦١- مسرحيتان من المسرح الإسبانى	أليخاندرو كاسونا وأنطونيو جالا	زيدان عبدالحليم زيدان
١٦٢- تاريخ الكنيسة	يوحنا الآسيوى	صلاح عبدالعزيز محجوب
١٦٣- موسوعة علم الاجتماع (جـ ١)	جوردون مارشال	بإشراف: محمد الجوهرى
١٦٤- شامبوليون (حياة من نور)	چان لاكوتير	نبيل سعد
١٦٥- حكايات الثعلب (قصص أطفال)	أ. ن. أفاناسيفا	سهير المصادفة
١٦٦- العلاقات بين المتدينين والعلمانيين فى إسرائيل	يشعياهو ليڤمان	محمد محمود أبوغدير
١٦٧- فى عالم طاغور	رابندرنات طاغور	شكرى محمد عياد
١٦٨- دراسات فى الأدب والثقافة	مجموعة من المؤلفين	شكرى محمد عياد
١٦٩- إبداعات أدبية	مجموعة من المؤلفين	شكرى محمد عياد
١٧٠- الطريق (رواية)	ميجيل دليبيس	بسام ياسين رشيد
١٧١- وضع حد (رواية)	فرانك بيجو	هدى حسين
١٧٢- حجر الشمس (شعر)	نخبة	محمد محمد الخطابى
١٧٣- معنى الجمال	ولتر ت. ستيس	إمام عبد الفتاح إمام
١٧٤- صناعة الثقافة السوداء	إيليس كاشمور	أحمد محمود
١٧٥- التليفزيون فى الحياة اليومية	لورينزو فيلشس	وجيه سمعان عبد المسيح
١٧٦- نحو مفهوم للاقتصاديات البيئية	توم تيتنبرج	جلال البنا
١٧٧- أنطون تشيخوف	هنرى ترويا	حصة إبراهيم المنيف
١٧٨- مختارات من الشعر اليونانى الحديث	نخبة من الشعراء	محمد حمدى إبراهيم
١٧٩- حكايات أيسوب (قصص أطفال)	أيسوب	إمام عبد الفتاح إمام
١٨٠- قصة جاويد (رواية)	إسماعيل فصيح	سليم عبد الأمير حمدان
١٨١- النقد الأدبى الأمريكى من الثلاثينيات إلى الثمانينيات	فنسنت ب. ليتش	محمد يحيى
١٨٢- العنف والنبوءة (شعر)	و.ب. ييتس	ياسين طه حافظ
١٨٣- چان كوكتو على شاشة السينما	رينيه جيلسون	فتحى العشرى
١٨٤- القاهرة: حالمة لا تنام	هانز إبندورفر	دسوقى سعيد
١٨٥- أسفار العهد القديم فى التاريخ	توماس تومسن	عبد الوهاب علوب
١٨٦- معجم مصطلحات هيجل	ميخائيل إنوود	إمام عبد الفتاح إمام
١٨٧- الأرضة (رواية)	بُزرج علوى	محمد علاء الدين منصور
١٨٨- موت الأدب	ألفين كرنان	بدر الديب

١٨٩-	العمى والبصيرة: مقالات في بلاغة النقد المعاصر	پول دی مان	سعيد الغانمی
١٩٠-	محاورات كونفوشيوس	كونفوشيوس	محسن سيد فرجانی
١٩١-	الكلام رأسمال وقصص أخرى	الحاج أبو بكر إمام وآخرون	مصطفى حجازى السيد
١٩٢-	سياحت نامه إبراهيم بك (جـ١)	زين العابدين المراغى	محمود علاوى
١٩٣-	عامل المنجم (رواية)	بيتر أبراهامز	محمد عبد الواحد محمد
١٩٤-	مختارات من النقد الأنجلو-أمريكي الحديث	مجموعة من النقاد	ماهر شفيق فريد
١٩٥-	شتاء ٨٤ (رواية)	إسماعيل فصيح	محمد علاء الدين منصور
١٩٦-	المهلة الأخيرة (رواية)	فالنتين راسبوتين	أشرف الصباغ
١٩٧-	سيرة الفاروق	شمس العلماء شبلى النعمانى	جلال السعيد الحفناوى
١٩٨-	الاتصال الجماهيرى	إدوين إمرى وآخرون	إبراهيم سلامة إبراهيم
١٩٩-	تاريخ يهود مصر فى الفترة العثمانية	يعقوب لانداو	جمال أحمد الرفاعي وأحمد عبد اللطيف حماد
٢٠٠-	ضحايا التنمية: المقاومة والبدائل	جيرمى سيبروك	فخرى لبيب
٢٠١-	الجانب الدينى للفلسفة	جوزايا رويس	أحمد الأنصارى
٢٠٢-	تاريخ النقد الأدبى الحديث (جـ٤)	رينيه ويليك	مجاهد عبد المنعم مجاهد
٢٠٣-	الشعر والشاعرية	ألطاف حسين حالى	جلال السعيد الحفناوى
٢٠٤-	تاريخ نقد العهد القديم	زالمان شازار	أحمد هويدى
٢٠٥-	الجينات والشعوب واللغات	لويجى لوقا كافاللى- سفورزا	أحمد مستجير
٢٠٦-	الهيولية تصنع علمًا جديدًا	جيمس جلايك	على يوسف على
٢٠٧-	ليل أفريقى (رواية)	رامون خوتاسندير	محمد أبو العطا
٢٠٨-	شخصية العربى فى المسرح الإسرائيلى	دان أوريان	محمد أحمد صالح
٢٠٩-	السرد والمسرح	مجموعة من المؤلفين	أشرف الصباغ
٢١٠-	مثنويات حكيم سنائى (شعر)	سنائى الغزنوى	يوسف عبد الفتاح فرج
٢١١-	فردينان دوسوسير	جوناثان كلر	محمود حمدى عبد الغنى
٢١٢-	قصص الأمير مرزبان على لسان الحيوان	مرزبان بن رستم بن شروين	يوسف عبدالفتاح فرج
٢١٣-	مصر منذ قدوم نابليون حتى رحيل عبدالناصر	ريمون فلاور	سيد أحمد على الناصرى
٢١٤-	قواعد جديدة للمنهج فى علم الاجتماع	أنتونى جيدنز	محمد محيى الدين
٢١٥-	سياحت نامه إبراهيم بك (جـ٢)	زين العابدين المراغى	محمود علاوى
٢١٦-	جوانب أخرى من حياتهم	مجموعة من المؤلفين	أشرف الصباغ
٢١٧-	مسرحيتان طليعيتان	صمويل بيكيت وهارولد بينتر	نادية البنهاوى
٢١٨-	لعبة الحجلة (رواية)	خوليو كورتاثان	على إبراهيم منوفى
٢١٩-	بقايا اليوم (رواية)	كازو إيشجورو	طلعت الشايب
٢٢٠-	الهيولية فى الكون	بارى باركر	على يوسف على
٢٢١-	شعرية كفافى	جريجورى جوزدانيس	رفعت سلام
٢٢٢-	فرانز كافكا	رونالد جراى	نسيم مجلى
٢٢٣-	العلم فى مجتمع حر	پاول فيرابند	. محمد نفادى
٢٢٤-	دمار يوغسلافيا	برانكا ماجاس	منى ظاهر إبراهيم
٢٢٥-	حكاية غريق (رواية)	جابرييل جارثيا ماركيث	السيد عبدالظاهر السيد
٢٢٦-	أرض ... وقصائد أخرى	ديفيد هربت لورانس	طاهر محمد على البربرى

٢٢٧-	المسرح الإسبانى فى القرن السابع عشر	خوسيه ماريا ديث بوركى	السيد عبدالظاهر عبدالله
٢٢٨-	علم الجمالية وعلم اجتماع الفن	جانيت وولف	مارى تيريز عبدالمسيح وخالد حسن
٢٢٩-	مأزق البطل الوحيد	نورمان كيجان	أمير إبراهيم العمرى
٢٣٠-	عن الذباب والفئران والبشر	فرانسواز جاكوب	مصطفى إبراهيم فهمى
٢٣١-	الدرافيل أو الجيل الجديد (مسرحية)	خايمى سالوم بيدال	جمال عبدالرحمن
٢٣٢-	ما بعد المعلومات	توم ستونير	مصطفى إبراهيم فهمى
٢٣٣-	فكرة الاضمحلال فى التاريخ الغربى	أرثر هيرمان	طلعت الشايب
٢٣٤-	الإسلام فى السودان	ج. سبنسر تريمنجهام	فؤاد محمد عكود
٢٣٥-	ديوان شمس تبريزى (جـ١)	مولانا جلال الدين الرومى	إبراهيم الدسوقى شتا
٢٣٦-	الولاية	ميشيل شودكيفيتش	أحمد الطيب
٢٣٧-	مصر أرض الوادى	روبين فيدين	عنايات حسين طلعت
٢٣٨-	العولمة والتحرير	تقرير لمنظمة الأنكتاد	ياسر محمد جادالله وعربى مدبولى أحمد
٢٣٩-	العربى فى الأدب الإسرائيلى	جيلا رامراز - رايوخ	نادية سليمان حافظ وإيهاب صلاح فايق
٢٤٠-	الإسلام والغرب وإمكانية الحوار	كاى حافظ	صلاح محجوب إدريس
٢٤١-	فى انتظار البرابرة (رواية)	ج . م. كوتزى	ابتسام عبدالله
٢٤٢-	سبعة أنماط من الغموض	وليام إمبسون	صبرى محمد حسن
٢٤٣-	تاريخ إسبانيا الإسلامية (مج١)	ليفى بروفنسال	بإشراف: صلاح فضل
٢٤٤-	الغليان (رواية)	لاورا إسكيبيل	نادية جمال الدين محمد
٢٤٥-	نساء مقاتلات	إليزابيتا أديس وآخرون	توفيق على منصور
٢٤٦-	مختارات قصصية	جابرييل جارثيا ماركيث	على إبراهيم منوفى
٢٤٧-	الثقافة الجماهيرية والحداثة فى مصر	والتر أرمبرست	محمد طارق الشرقاوى
٢٤٨-	حقول عدن الخضراء (مسرحية)	أنطونيو جالا	عبداللطيف عبدالحليم
٢٤٩-	لغة التمزق (شعر)	دراجو شتامبوك	رفعت سلام
٢٥٠-	علم اجتماع العلوم	دومنيك فينك	ماجدة محسن أباظة
٢٥١-	موسوعة علم الاجتماع (جـ٢)	جوردون مارشال	بإشراف: محمد الجوهرى
٢٥٢-	رائدات الحركة النسوية المصرية	مارجو بدران	على بدران
٢٥٣-	تاريخ مصر الفاطمية	ل. أ. سيمينوفا	حسن بيومى
٢٥٤-	أقدم لك: الفلسفة	ديف روبنسون وجودى جروفز	إمام عبد الفتاح إمام
٢٥٥-	أقدم لك: أفلاطون	ديف روبنسون وجودى جروفز	إمام عبد الفتاح إمام
٢٥٦-	أقدم لك: ديكارت	ديف روبنسون وكريس جارات	إمام عبد الفتاح إمام
٢٥٧-	تاريخ الفلسفة الحديثة	وليم كلى رايت	محمود سيد أحمد
٢٥٨-	الفجر	سير أنجوس فريزر	عُبادة كُحيلة
٢٥٩-	مختارات من الشعر الأرمنى عبر العصور	نخبة	فاروجان كازانجيان
٢٦٠-	موسوعة علم الاجتماع (جـ٣)	جوردون مارشال	بإشراف: محمد الجوهرى
٢٦١-	رحلة فى فكر زكى نجيب محمود	زكى نجيب محمود	إمام عبد الفتاح إمام
٢٦٢-	مدينة المعجزات (رواية)	إدواردو مندوثا	محمد أبو العطا
٢٦٣-	الكشف عن حافة الزمن	چون جريبين	على يوسف على
٢٦٤-	إبداعات شعرية مترجمة	هوراس وشلى	لويس عوض

٢٦٥-	روايات مترجمة	أوسكار وايلد وصمويل جونسون	لويس عوض
٢٦٦-	مدير المدرسة (رواية)	جلال آل أحمد	عادل عبدالمنعم على
٢٦٧-	فن الرواية	ميلان كونديرا	بدر الدين عرودكى
٢٦٨-	ديوان شمس تبريزى (جـ٢)	مولانا جلال الدين الرومى	إبراهيم الدسوقى شتا
٢٦٩-	وسط الجزيرة العربية وشرقها (جـ١)	وليم چيفور بالجريف	صبرى محمد حسن
٢٧٠-	وسط الجزير العربية وشرقها (جـ٢)	وليم چيفور بالجريف	صبرى محمد حسن
٢٧١-	الحضارة الغربية: الفكرة والتاريخ	توماس سى. باترسون	شوقى جلال
٢٧٢-	الأديرة الأثرية فى مصر	سى. سى. والترز	إبراهيم سلامة إبراهيم
٢٧٣-	الأصول الاجتماعية والثقافية لحركة عرابى فى مصر	جوان كول	عنان الشهاوى
٢٧٤-	السيدة باربارا (رواية)	رومولو جاييجوس	محمود على مكى
٢٧٥-	ت. س. إليوت شاعراً وناقداً وكاتباً مسرحياً	مجموعة من النقاد	ماهر شفيق فريد
٢٧٦-	فنون السينما	مجموعة من المؤلفين	عبدالقادر التلمسانى
٢٧٧-	الچينات والصراع من أجل الحياة	براين فورد	أحمد فوزى
٢٧٨-	البدايات	إسحاق عظيموف	ظريف عبدالله
٢٧٩-	الحرب الباردة الثقافية	ف.س. سوندرز	طلعت الشايب
٢٨٠-	الأم والنصيب وقصص أخرى	بريم شند وآخرون	سمير عبدالحميد إبراهيم
٢٨١-	الفردوس الأعلى (رواية)	عبد الحليم شرر	جلال الحفناوى
٢٨٢-	طبيعة العلم غير الطبيعية	لويس وولبرت	سمير حنا صادق
٢٨٣-	السهل يحترق وقصص أخرى	خوان رولفو	على عبد الروف البمبى
٢٨٤-	هرقل مجنوناً (مسرحية)	يوريبيديس	أحمد عتمان
٢٨٥-	رحلة خواجة حسن نظامى الدهلوى	حسن نظامى الدهلوى	سمير عبد الحميد إبراهيم
٢٨٦-	سياحت نامه إبراهيم بك (جـ٣)	زين العابدين المراغى	محمود علاوى
٢٨٧-	الثقافة والعولمة والنظام العالمى	أنتونى كنج	محمد يحيى وآخرون
٢٨٨-	الفن الروائى	ديفيد لودج	ماهر البطوطى
٢٨٩-	ديوان منوچهرى الدامغانى	أبو نجم أحمد بن قوص	محمد نور الدين عبدالمنعم
٢٩٠-	علم اللغة والترجمة	جورج مونان	أحمد زكريا إبراهيم
٢٩١-	تاريخ المسرح الإسبانى فى القرن العشرين (جـ١)	فرانشسكو رويس رامون	السيد عبد الظاهر
٢٩٢-	تاريخ المسرح الإسبانى فى القرن العشرين (جـ٢)	فرانشسكو رويس رامون	السيد عبد الظاهر
٢٩٣-	مقدمة للأدب العربى	روجر آلن	مجدى توفيق وآخرون
٢٩٤-	فن الشعر	بوالو	رجاء ياقوت
٢٩٥-	سلطان الأسطورة	جوزيف كامبل وبيل موريز	بدر الديب
٢٩٦-	مكبث (مسرحية)	وليم شكسبير	محمد مصطفى بدوى
٢٩٧-	فن النحو بين اليونانية والسريانية	ديونيسيوس ثراكس ويوسف الأهوازى	ماجدة محمد أنور
٢٩٨-	مأساة العبيد وقصص أخرى	نخبة	مصطفى حجازى السيد
٢٩٩-	ثورة فى التكنولوجيا الحيوية	جين ماركس	هاشم أحمد محمد

طبع بالهيئة العامة لشئون المطابع الأميرية

رقم الإيداع ٢٠٣٧٤ / ٢٠٠٥







Revolutien in Biotechnology

يشتمل هذا الكتاب على ستة عشر فصلا . والتى تعتمد أساسا على دراسة الوراثة والجينات فى الكائنات الحية الدقيقة ، ومدى الافادة منها فى تخليق البروتين . وكذلك دراسة الأحماض النووية (RNA و DNA) . وكذلك دراسة تثبيت النتروجين ودور البكتريا فيه . ففى مجال الطب قدمت الهندسة الوراثية أمالا كبيرة لامكانية الشفاء من كثير من الأمراض الوراثية . ومن أكثرها خطرا الايدز والسرطان . وفى مجال الصيدلة وصناعة الدواء أصبح فى متناول المرضى الكثير من منتجات الهندسة الوراثية التى شملت اللقاحات والأمصال والأنترفيرون وهرمون الانسولين وهرمون النمو البشرى . وفى مجال المنتجات الصناعية المهندسة وراثيا ظهر فى الأسواق المطاط والبلاستيك والألياف والمبيدات الحشرية ومنظمات النمو والأسمدة والمبيدات العضوية والمنظفات البيولوجية . وامكن استخدام سلالات من البكتريا فى تخليص البيئة من التلوث .

الغلاف : محمد بغدادى